Zur vergleichenden Biochemie des Tyrosinstoffwechsels

Constantin E. Sekeris

1962

AUS DEM PHYSIOLOGISCH-CHEMISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Komm. Direktor: Prof. Dr. P. Karlson

Zur vergleichenden Biochemie des Tyrosinstoffwechsels

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Constantin E. Sekeris
aus Nauplia/Griechenland

München 1962

A. Schubert, München 5, Cornelliusstr. 21 · Telefon 22 17 77

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Professor Dr. P. Karlson
Correferent:	Professor Dr. A. Forst
Dekan:	Professor Dr. W. Seitz

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Die vorliegende Arbeit wurde im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr. Peter Karlson in der Zeit vom September 1959 bis März 1961 ausgeführt.

Herrn Professor Dr. Peter Karlson möchte ich für sein reges Interesse und die stete Förderung dieser Arbeit sehr herzlich danken.
Für die freundliche Aufnahme in seinem Institut und Arbeitskreis bin ich Herrn Professor Dr.Adolf Butenandt zu aufrichtigem Dank verpflichtet.
Die Arbeit wurde durch die großzügige Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes ermöglicht.
Die freundschaftlichen Ratschläge von Herrn G. Weirich halfen mir über die Sprachschwierigkeiten beim Abfassen der Arbeit hinweg.
Frl. J. Köhler danke ich für die Aufnahme der IR-Spektra.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0080

Gliederung

Seite

A Einleitung 7

B Allgemeiner Teil 8

I. Allgemeines über Tyrosin 8
1. Stoffwechsel von Tyrosin beim Menschen . . 8
a) Abbau zu Acetessigsäure 9
b) Umwandlung zum Noradrenalin und Adrenalin 11
c) Umwandlung zum Thyroxin 12
d) Umwandlung zum Melanin 12
e) Umwandlung zum Tyramin 14
2. Umwandlung von Tyrosin bei Mikroorganismen 14
3. Tyrosinstoffwechsel bei Pflanzen 14
4. Tyrosinstoffwechsel bei Insekten 17
a) Sklerotisierung 17

II. Ziel der Arbeit 20
1. Isolierung und Identifizierung eines o-Diphenols aus Calliphora Erythrocephala Larven 21
2. Identifizierung des N-acetyldopamins als Sklerotisierungssubstanz 25
3. Beweis für die Entstehung der Sklerotisierungssubstanz aus Tyrosin 31
4. Der Stoffwechsel von Tyrosin in den verschiedenen Larvenstadien 31
a) Enzymatische Methoden 32
b) Injektion von radioaktiv markierten Substanzen 36
c) Einbauversuche an der Puppencuticula . . 42
5. Einfluß von Hormonen auf die enzymatischen Vorgänge 44

III. Diskussion 47

C Experimenteller Teil 50

I. Allgemeine Methodik 50

II. Beschreibung der Versuche 53

D Zusammenfassung 60

E Literaturverzeichnis 62

E I N L E I T U N G

Die Entwicklung der Biologie und Medizin verdankt seit jeher dem Einfluß der vergleichenden Wissenschaften besonders wertvolle Anregungen. Zuerst die vergleichende Anatomie und später auch die vergleichende Physiologie haben den Fortschritt dieser Wissenschaften durch neue Fragestellungen und Gesichtspunkte vorangetrieben. Es sei hier nur an die Entwicklung der Abstammungslehre von DARWIN erinnert, die zum großen Teil auf den Ergebnissen dieser vergleichenden Wissenschaften beruht.

In neuerer Zeit hat für die Entwicklung der biologischen und medizinischen Forschung die vergleichende Biochemie außerordentlich große Bedeutung erlangt. Das Studium sowohl der gemeinsamen Grunderscheinungen des Lebens als auch der Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies, die Erforschung der Entstehung des Lebens sowie der Ursachen für die Abweichungen vom normalen Verhalten sind Themen, zu denen die vergleichende Biochemie wichtige Beiträge leistet.

Einige Beispiele aus dem Gebiet der Insektenphysiologie mögen diese Tatsache veranschaulichen. Zu den wichtigsten biologischen Entdeckungen der letzten Jahre gehört die Erkenntnis, daß Gene, die Träger der Erbinformation aller Lebewesen, durch Enzyme wirken (BUTENANDT et al, 1, 2, 3) und daß Hormone Genloci aktivieren können (CLEVER u. KARLSON, 4). Die Gen-Enzymwirkung wurde bei biochemischen Studien über die Pigmentbildung bei Schmetterlingen entdeckt, während die Feststellung der genaktivierenden Wirkung von Hormonen durch die erste Isolierung eines Hormones aus Insekten, des Ecdysons, begünstigt war (BUTENANDT und KARLSON, 5).

Die Untersuchung einer Farbstoffklasse aus Fliegen und Pieriden (Lepidoptera), ihre Strukturermittlung und Charakterisierung als Pteridinderivate hat zum Verständnis von für

den intermediären Stoffwechsel wichtigen Vitaminen erheblich beigetragen. Die Vitamine der Folsäuregruppe konnten als Verbindungen des gleichen Typus wie die erwähnten Insektenfarbstoffe identifiziert werden.

Die vergleichende Biochemie des Tyrosinstoffwechsels ist das Thema dieser Arbeit.

Bevor die eigenen experimentellen Untersuchungen geschildert werden, sollen die bisher bekannten Umwandlungen von Tyrosin in den verschiedenen untersuchten Tierarten besprochen werden.

B. A L L G E M E I N E R T E I L

I. ALLGEMEINES ÜBER TYROSIN

(a-Amino-ß-(p-hydroxyphenyl)-propionsäure)

Zum ersten Male hat LIEBIG [6] 1846 die Aminosäure als Produkt von alkalischer Spaltung des Kaseins gefunden. Die Strukturermittlung gelang ERLENMEYER und KIPP [7] durch Synthese. Es handelt sich um eine in Wasser schwerlösliche, aromatische Aminosäure, die in der Natur sehr verbreitet ist. Im allgemeinen ist die L-Form durch Stoffwechsel umwandelbar, einige Organismen (Bakterien [8], Ratten [9] u.a.) können auch die D-Form abbauen.

1. Stoffwechsel von Tyrosin beim Menschen (10, 11 , 12)

Tyrosin dient als Ausgangssubstanz für die Hormone des Nebennierenmarkes (Noradrenalin und Adrenalin) sowie der Schilddrüse (Thyroxin). Es ist keine essentielle Aminosäure, weil es durch nicht reversible Hydroxylierung von Phenylalanin gebildet werden kann (s. Abb.1). Notwendig für die Bildung ist die Anwesenheit von zwei Enzymfraktionen, Sauerstoff, einem Derivat der Folsäure und von TPNH (13, 14, 15).

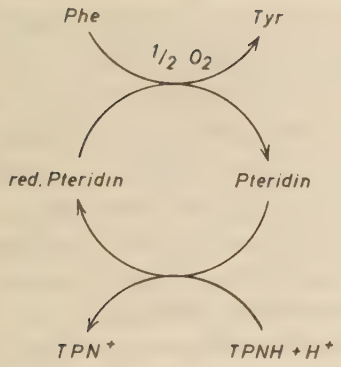


Abb.1. Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin

Tyrosin gehört zu den ketoplastischen Aminosäuren, weil der größte Teil zu Acetessigsäure abgebaut wird.

a) Abbau zu Acetessigsäure

Als erster hat NEUBAUER (16, 17) den Weg zu Acetessigsäure formuliert, seine Theorie wurde während der letzten Jahre bestätigt und durch Verwendung von Leberenzymsystemen weiter ausgebaut (s. Abb. 2).

Der erste Reaktionsschritt ist die Umwandlung von Tyrosin zu p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure. Dazu sind Pyridoxalphosphat und α-Ketoglutarsäure nötig. Ammoniak wird nicht freigesetzt, sondern der Stickstoff wird in Form von Amin wiedergefunden (Glutaminsäure). Es handelt sich also um eine Transaminierungsreaktion (18, 19, 20).

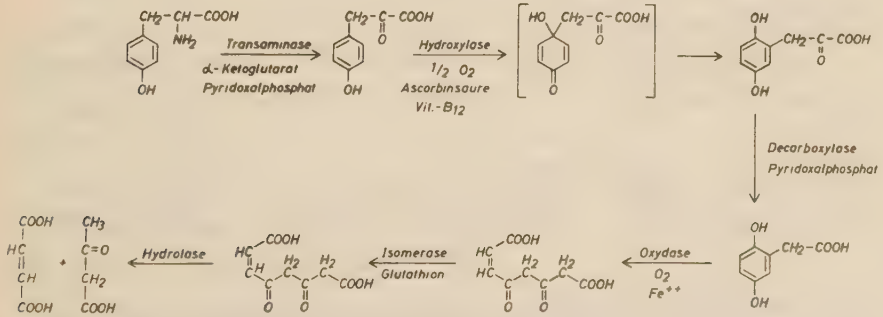


Abb. 2. Abbau von Tyrosin zu Acetessigsäure.

Der nächste mit Sicherheit isolierte Metabolit ist Homogentisinsäure (21). Als Zwischenstufe zur Homogentisinsäure wird 2,5-Dihydroxy-phenyl-brenztraubensäure betrachtet (22), die durch Hydroxylierung von p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure zum Chinol und Umlagerung der Seitenkette gebildet wird. Daß die Seitenkette umgelagert wird, ist durch Versuche mit C^{14}-markiertem Tyrosin nachgewiesen worden (23). Für die weitere Oxydation von Homogentisinsäure ist die Gegenwart von Eisenionen und Ascorbinsäure nötig. Als Oxydationsprodukt wurde Maleylacetessigsäure isoliert (24), die durch eine Isomerase und Glutathion zu Fumarylacetessigsäure isomerisiert wird (25). Diese wird durch die Einwirkung einer Hydrolase zu Fumarsäure und Acetessigsäure gespalten. Der ganze Prozeß erfordert 4 Atome Sauerstoff pro Mol-Tyrosin.

Es gibt verschiedene Krankheitszustände, in welchen der Abbau des Tyrosins infolge Mangels des entsprechenden Enzyms an einer bestimmten Stelle unterbrochen ist (s. Abb.3).

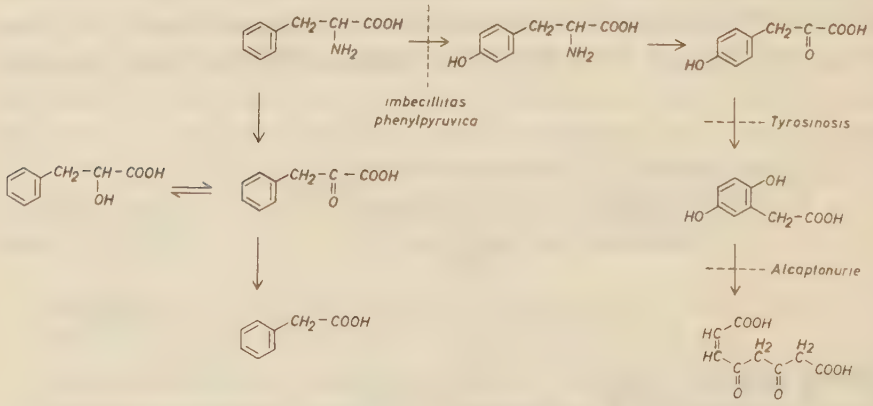


Abb.3. Störung des Tyrosinstoffwechsels

Für den Ausfall eines Enzyms als Ursache für eine Stoffwechselstörung hat GARROD (26) die Bezeichnung "inborn error

of metabolism" eingeführt.

Bei Imbecillitas phenylpyruvica ist die Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin nicht möglich, was zu einer Anhäufung von Phenylalanin, Phenylbrenztraubensäure, Phenylmilchsäure, Phenylessigsäure und Phenylacetylglutamin führt. Diese Substanzen werden in geringer Menge auch bei normalen Menschen gefunden; ein Zeichen, daß ein geringer Teil des Phenylalanins auch im gesunden Organismus auf diesem Wege abgebaut wird.

Bei der Tyrosinosis (27) ist die Kette am Punkt der Umwandlung von p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure zu Homogentisinsäure unterbrochen, was zur Anhäufung von p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure und Tyrosin führt. Das ist auch der Fall bei Vitamin C - Mangel, bei perniziöser Anämie und bei Frühgeburten.

Bei der Alkaptonurie liegt der Block bei der Umwandlung von Homogentisinsäure. In diesem Fall konnte ein Mangel an Homogentisinsäureoxydase in der Leber der Patienten nachgewiesen werden (28). Die angestaute Homogentisinsäure wird in Knorpelstrukturen angelagert, die durch deren Oxydationsprodukte gefärbt werden (Ochronose).

b) Umwandlung zum Noradrenalin und Adrenalin

Tyrosin und Phenylalanin sind die Muttersubstanzen dieser Hormone. Dies konnte durch Verwendung von Tritium-markiertem Phenylalanin sowie C^{14}-Phenylalanin und -Tyrosin und anschließende Isolierung der markierten Catecholamine gezeigt werden (29, 30).

Zuerst wird Tyrosin zu Dopa oxydiert, welches dann weiter zu Dopamin decarboxyliert wird. Tyramin tritt in dieser Reaktionskette nicht auf (31, 32).

Das Dopamin wird durch eine ß-Oxydase, ATP und Ascorbinsäure zum Noradrenalin umgewandelt (33, 34), das durch aktives Methyl zu Adrenalin N-methyliert wird (s. Abb. 4.).

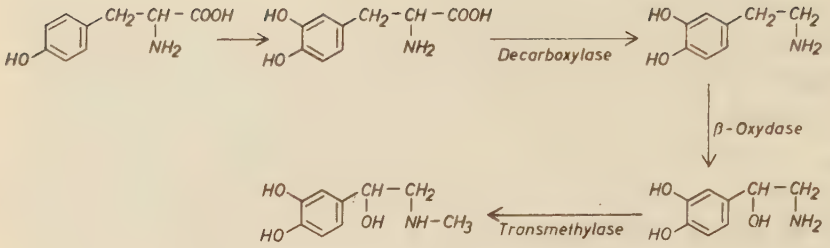


Abb.4. Umwandlung von Tyrosin zum Adrenalin

c) Umwandlung zum Thyroxin (35, 36)

Als erster Schritt zur Biosynthese des Thyroxins tritt die Oxydation des Jodanions zum freien Jod auf, das in den Tyrosinrest eingeführt wird, zuerst als Monojod-, später als 3,5-Dijodderivat. Die nächste Stufe ist die Bildung des Diphenyläthersystems, die wahrscheinlich über Semichinonradikale verläuft (s. Abb.5.).

d) Umwandlung zu Melanin (37, 38, 39)

Unter Melaninen verstehen wir braunschwarze Farbstoffe, die sowohl im Menschen als auch in anderen Säugetieren, in Fischen, Mollusken, Insekten, Pflanzen usw. zu finden sind.

Fast alle o- und p-substituierten Polyhydroxyphenole und Aminophenole können zu Melanin oxydiert werden. Für den Menschen ist Tyrosin bzw. Dopa die Muttersubstanz (Dopamelanin) (40). Der Verlauf der von RAPER, MASON, BU'LOCK u.a. (41-45) aufgeklärten Umwandlung ist aus Abb. 6 ersichtlich. Die anfänglich umstrittene Frage, ob die Oxydation von Tyrosin zu Dopa enzymatisch verläuft, ist heute geklärt. Es liegt tatsächlich eine enzymatische Reaktion vor, die durch das Kupferenzym Phenoloxydase katalysiert wird.

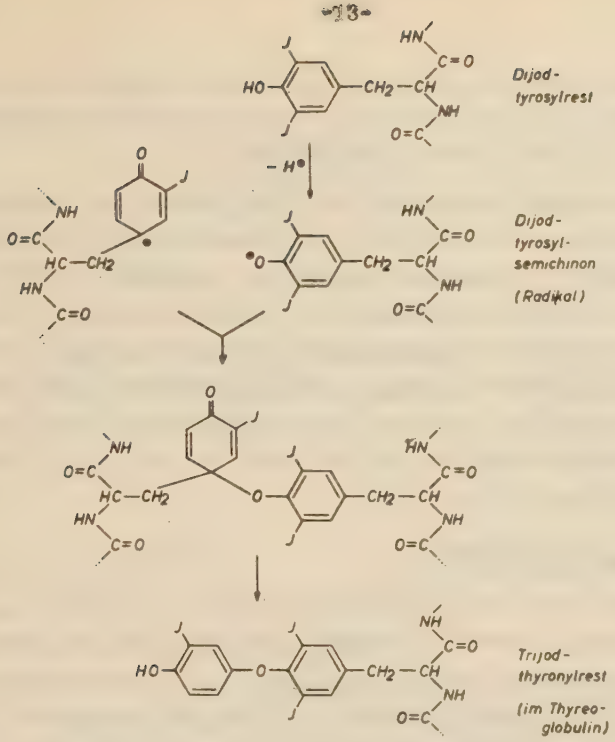


Abb.5. Umwandlung von Tyrosin zu Thyroxin (nach KARLSON, Kurzes Lehrb.d.Biochemie,2.Aufl.,Thieme,1961)

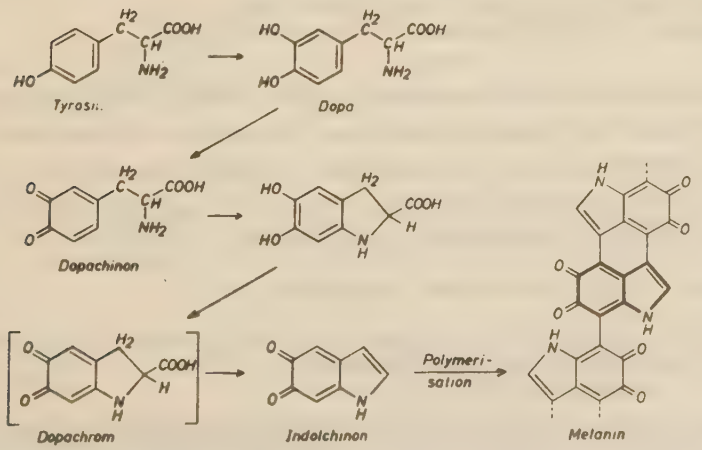


Abb.6. Umwandlung von Tyrosin zu Melanin (nach KARLSON, Kurzes Lehrb.d.Biochemie,2.Aufl.Thieme,1961)

Diese Phenoloxydase gehört zu einer Kategorie von Enzymen, deren Vertreter in vielen Tier- und Pflanzenarten vorkommen und die phenolische Substanzen umwandeln.

Das erste solche Enzym ist von BOURQUELOT und BERTRAND in Pilzen gefunden worden (46). Im Menschen ist das Enzym in geringer Menge in normalem Hautgewebe vorhanden (47), in stärkerem Maße jedoch in Melanomen. Die Substratspezifität des Enzyms aus verschiedener Organismen ist unterschiedlich. Für die menschliche Phenoloxydase ist Tyrosin das beste Substrat, es handelt sich also um eine echte Tyrosinase. Bei dem Insekt Calliphora erythrocephala ist Dopamin das optimale Substrat der Phenoloxydase (48).

e) Umwandlung zu Tyramin

Zu Tyramin wird nur ein minimaler Teil des Tyrosins abgebaut. Aus Nieren wurde ein Enzym isoliert, welches Tyrosin zu Tyramin decarboxylieren kann (49, 50). Die Aktivität des Enzyms nimmt bei Nierenischämie zu. Man hat versucht, eine Erklärung für die Erhöhung des Blutdruckes bei Hypertonie in diesem Zusammenhang zu finden. Durch eine Amin -oxydase wird das Tyramin weiter zu p-Hydroxylphenylessigsäure abgebaut.

2. Umwandlung von Tyrosin bei Mikroorganismen

In Mikroorganismen gibt es eine große Anzahl von Enzymen, die eine Vielfalt von Umwandlungen des Tyrosins verursachen. Bei einigen Bakterien gibt es ähnliche Abbaureaktionen wie die des Säugetier-Leberenzymsystems (51, 52), bei anderen treten neue Stoffwechselreaktionen auf (53-56).

Einige dieser Reaktionen zeigt die Abb.7.

3. Tyrosinstoffwechsel bei Pflanzen

In den letzten Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen dem

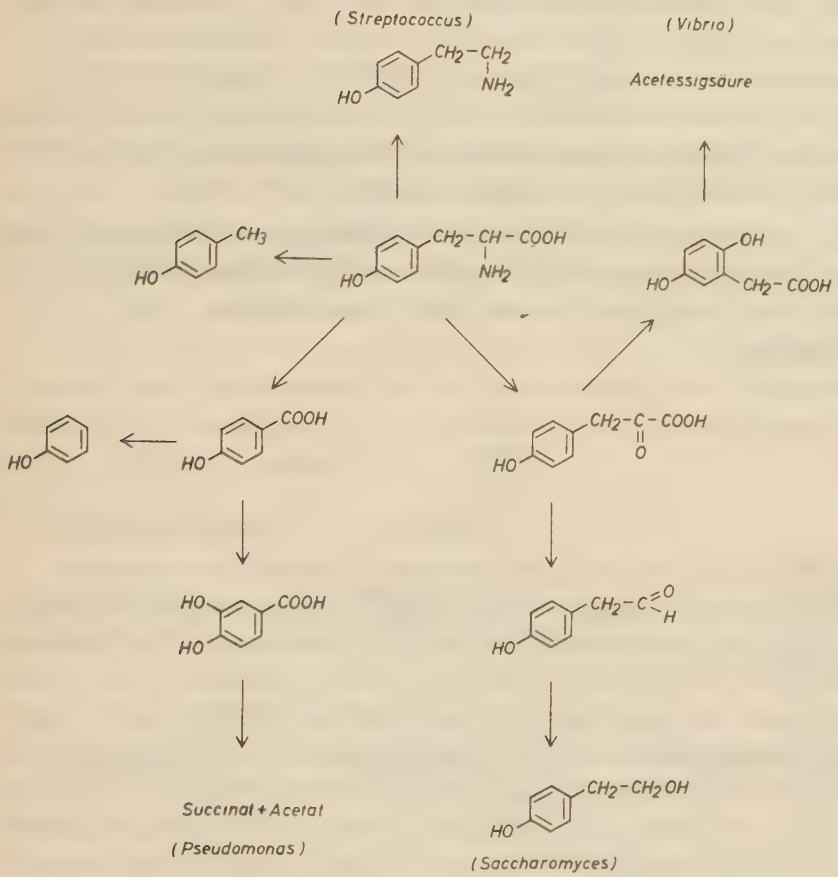


Abb.7. Umwandlung von Tyrosin in verschiedenen Mikroorganismen

Tyrosinstoffwechsel und der Verholzung der Pflanzen festgestellt.

Unter Verholzung verstehen wir die Bildung und Anhäufung des Lignins im Pflanzengewebe. Lignin ist ein polymerer Stoff,

der aus C_6-C_3-Einheiten aufgebaut ist. Es gibt verschiedene Sorten von Lignin, je nach der Art des C_6-C_3-Stückes. Im Falle des Koniferen-Lignins handelt es sich um Derivate des 4-Hydroxy-3-methoxyphenylpropans. Durch Verwendung von Radioisotopen konnten Shikimsäure und p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure als Vorstufen dieses Monomers nachgewiesen werden. Auch aktives Tyrosin wird in Lignin eingebaut (57, 58).

Die Auffindung einer Tyrosin-Transaminase in Pflanzen, die Tyrosin zu p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure umwandelt (59), liefert die Erklärung für den Weg dieses Einbaus (60). (s. Abb.8.).

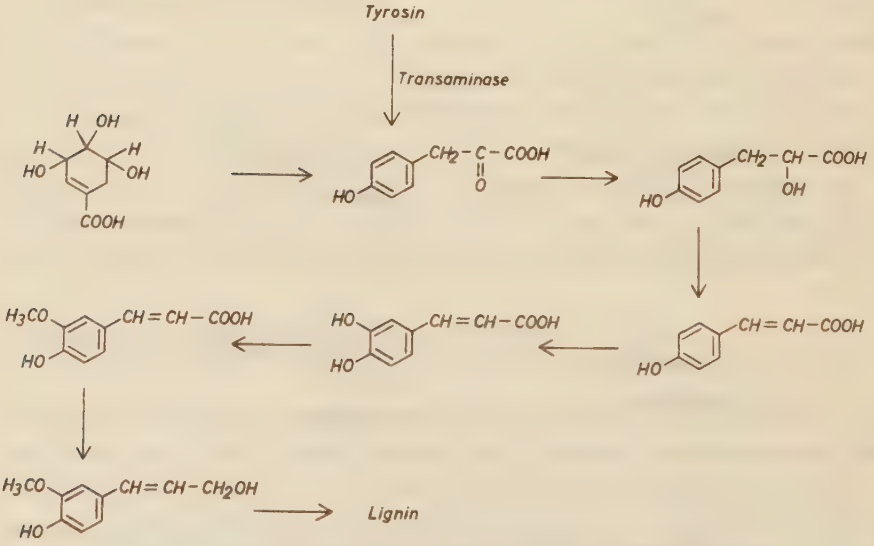


Abb.8. Umwandlung von Tyrosin zu Lignin

Die Monophenole können durch Phenoloxydasen oxydiert werden. Solche Phenoloxydasen wurden in verschiedenen Pflanzen gefunden (Champignon, Kartoffel, Banane u.a.). Sie verwandeln,

wie schon erwähnt, Phenole zu Melaninen. Die Bedeutung dieser Reaktion für die Pflanzen ist noch nicht geklärt.

4. Stoffwechsel von Tyrosin bei Insekten

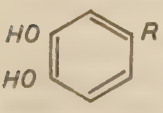
Erst in den letzten Jahren wurde damit begonnen, den allgemeinen Stoffwechsel von Insekten im Vergleich zu Säugetieren und Bakterien systematisch zu erforschen. Speziell über die Umwandlung von Tyrosin ist noch sehr wenig bekannt (61, 62).

Die Beziehung von Tyrosin zu dem für die Entwicklung des Insekts wichtigen Prozeß der Sklerotisierung der Larvenhaut während der Verpuppung ist ein Anreiz für die Untersuchung dieses Problems gewesen.

a) Sklerotisierung

Unter Sklerotisierung versteht man die Umwandlung der weichen und farblosen aus Protein und Chitin (polymeres N-acetylglucosamin) bestehenden letzten Larvencuticula. Sie ist durch zwei äußerlich feststellbare Veränderungen charakterisiert: eine Verhärtung und eine Verdunkelung. Die dadurch verursachte Puppariumbildung steht unter hormonaler Kontrolle und wird durch das von BUTENANDT und KARLSON (4) isolierte Hormon der Prothorakaldrüse, das Ekdyson, ausgelöst. Die chemischen Umwandlungen des Protein-Chitingerüstes, die bei der Sklerotisierung ablaufen und die von PRYOR, FRAENKEL, DENNELL, HACKMAN u.a. (63-68) untersucht wurden, sind noch nicht restlos geklärt.

Die überzeugendste Anschauung ist bis heute die, daß o-Diphenole vom allgemeinen Typ



, wobei R = -COOH, $-CH_2COOH$ oder $-CH_2CH(OH)COOH$

sein kann (69-73), für diese Veränderungen verantwortlich

sind. Diese Phenole werden zuerst in den äußeren Teilen der Cuticula (Epicuticula) von den dort vorhandenen Phenoloxydasen zu den entsprechenden Chinonen oxydiert, die dann zu den inneren Schichten der Kutikula diffundieren und dort mit den Proteinen zu Sklerotin reagieren. Die genaue Natur der Bindung zwischen den Chinonen und dem Protein-Chitinkomplex ist noch unbekannt. Es ist wahrscheinlich, daß die Chinone mit den terminalen Aminogruppen der Proteine, mit α-Aminogruppen von Lysin, vermutlich mit freien Aminogruppen des Chitins und auch SH-Gruppierungen von Protein reagieren, und zwar im Sinne einer Ringsubstitution oder Chinoniminbildung (s. Abb.9).

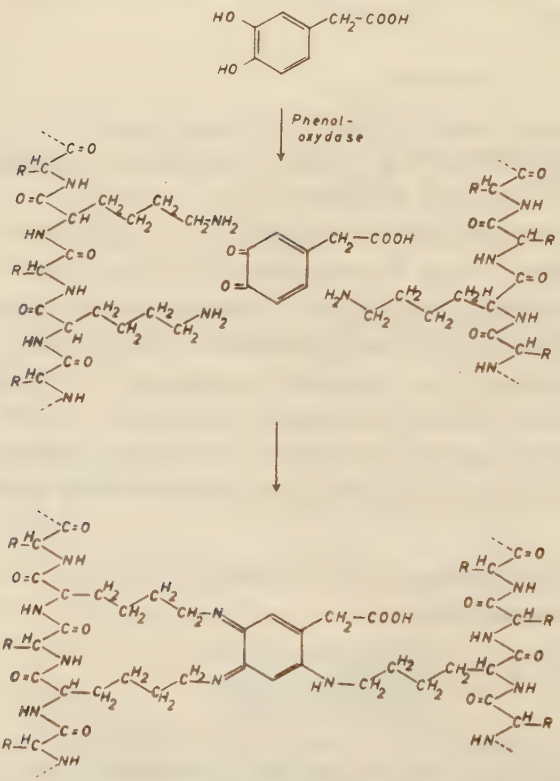


Abb.9. Schema der Sklerotisierung (aus Diss. Schweiger, München, 1960 s.7)

Die fast gleichzeitig erscheinende Melanisierung wird von einigen Autoren als Begleitphänomen der Sklerotisierung angesehen (wie die Gerbung von Leder mit p-Chinonen), von anderen aber als getrennter Prozeß, der auf der Bildung von Melanin beruht (74).

Bei Albinos der Wanderheuschrecke Schistocerca gregaria wird weiche Cuticula sklerotisiert, ohne daß eine gleichzeitige Umfärbung stattfindet. Radioaktiv markiertes Tyrosin wird nach Injektionen in vor der Adulthäutung stehende Tiere in gleicher Weise eingebaut wie bei normalen Tieren (KARLSON und RAECKE) (75).

Diese Befunde sowie das Auftreten von Melaninbanden in der Kutikula von Protophormia terranovae vor der Sklerotisierung (76), die Möglichkeit der Isolierung von Melanin aus sklerotisierter Kutikula und anderes sprechen für das Vorliegen zweier getrennter Prozesse (77-79).

Die in der Kutikula gefundenen o-Diphenole gelten, wie erwähnt, als Sklerotisierungssubstanz. Wegen struktureller Ähnlichkeit wird Tyrosin bzw. Dopa als ihre Muttersubstanz betrachtet, ohne daß diese Anschauung bisher bewiesen werden konnte. Daß Tyrosin für die Sklerotisierung eine große Bedeutung hat, ist von KARLSON (80, 81) nachgewiesen worden. Nach Injektion von C^{14}-Tyrosin in kurz vor der Verpuppung stehende Calliphoralarven und Untersuchung der Verteilung der Aktivität 24 Stunden nach der Puppariumbildung findet man 75-80 % der im ganzen Tier vorhandenen Aktivität im Puppentönnchen. Dieser Einbau hängt nachweisbar nicht mit einer Proteinbiosynthese zusammen. Bis zur Verpuppung steigt die Konzentration des freien Tyrosins in der Haemolymphe (72), fällt dann plötzlich ab, und während der Verpuppung verschwindet das freie Tyrosin auch aus der Kutikula (83). Auch dies spricht für die wichtige Rolle dieser Aminosäure im Verpuppungsprozeß.

II. ZIEL DER ARBEIT

Als Versuchsobjekt für die vorliegende Arbeit wurde die Schmeißfliege Calliphora erythrocephala (Diptera, Holometabola) verwandt. Die Abb.10 zeigt den zeitlichen Verlauf ihrer Postembryonalentwicklung.

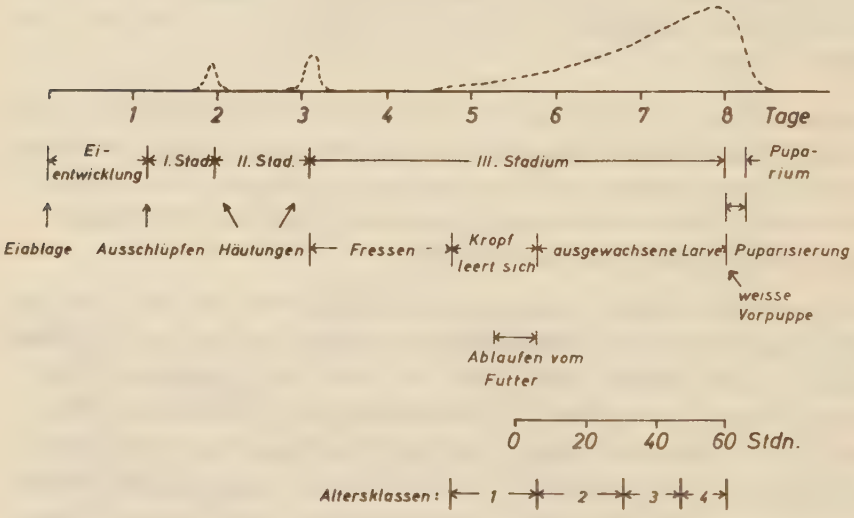


Abb.10. Entwicklungsstadien und Altersklassen der Calliphoralarven.
Gestrichelte Kurve - vermuteter Ecdysonspiegel.
(nach KARLSON und SCHWEIGER)

Die Tiere durchlaufen drei Larvenstadien, am Ende des 3. und letzten verpuppen sie sich. Während dieses dritten Larvenstadiums wurde von KARLSON und SCHWEIGER (84, 85) eine hormonabhängige Aktivierung der Phenoloxydase festgestellt. Im Anschluß an diese Arbeiten und an die schon zitierten Tyrosin-

Einbauversuche an Calliphorapuparien (KARLSON 80, 81) war es interessant, zu untersuchen, ob auch der Tyrosinstoffwechsel eine Abhängigkeit vom Alter und damit von der Hormonkonzentration der Tiere aufweist. Dabei wurde ein Diphenol gefunden, das offensichtlich als Sklerotisierungssubstanz eine Rolle spielt.

Es wurde weiterhin versucht, den Zusammenhang zwischen Tyrosinstoffwechsel und Sklerotisierungsprozeß aufzudecken, die Frage zu klären, ob und welche Bedeutung diese Aminosäure für die Biosynthese sklerotisierender Substanzen hat und über welche Zwischenstufen deren Synthese erfolgt.

Die Arbeit läßt sich in folgende Abschnitte einteilen:

1.) Charakterisierung eines aus Calliphora erythrocephala isolierten o-Diphenols
2.) Identifizierung dieses Diphenols als Sklerotisierungssubstanz
3.) Beweis der Entstehung dieses Phenols aus Tyrosin
4.) Aufklärung des Weges von Tyrosin zur Sklerotisierungssubstanz sowie die übrigen Umwandlungen des Tyrosins in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Larve
5.) Untersuchung über den Einfluß von Hormonen auf die Steuerung enzymatischer Reaktionen.

1. Isolierung und Identifizierung eines o-Diphenols aus Calliphora Erythrocephala Larven

Sieben Tage alte Larven wurden mit 80 % Methanol extrahiert (s.Exp.Teil) und der Extrakt nach Rotationsverdampfung papierchromatographiert (Syst 1). Die Entwicklung des Chromatogramms mit Pauly's Reagenz ergab einen purpurnen U.V.-absorbierenden Fleck mit dem Rf 0,8. Diese "Rf 0,8-Substanz" zeigte ferner die folgenden Farbreaktionen:

mit ammoniakalischem Silbernitrat	- schwarz
mit Eisenchlorid	- grün

mit Kaliumferricyanid - schwach rosa und
mit Ninhydrin - keine Farbreaktion.

Bei der Papierelektrophorese in Phosphat-Puffer von pH 6,8 zeigte die Substanz keine, in einem Puffer von pH 7,4 eine sehr schwache Wanderung nach der Anode (s. Abb. 11 a), b)).

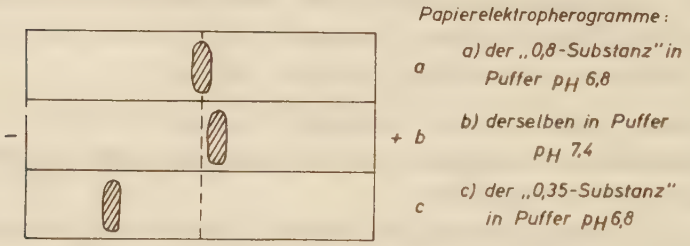


Abb. 11

Das U.V. Spektrum zeigte Maxima auf 279 und 205 mμ (s.Abb.12).

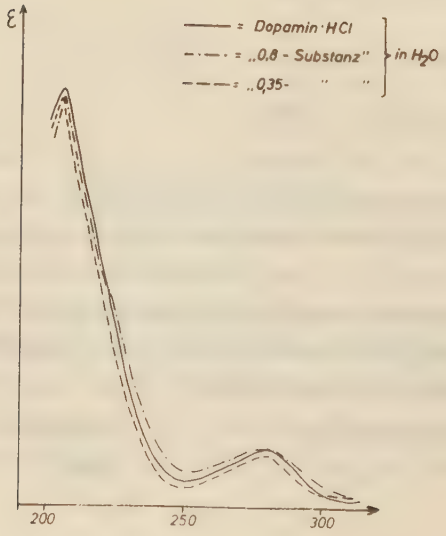


Abb.12.
U.V. Spektra von
Dopamin.HCL = ———
"0,8-Substanz"= -.-.-.-
"0,35-Substanz"= -------

Diese Eigenschaften deuten auf ein Diphenol hin. Der negative Ausfall der Reaktion mit Ninhydrin zeigt, daß die Substanz keine freie Aminogruppe besitzt.

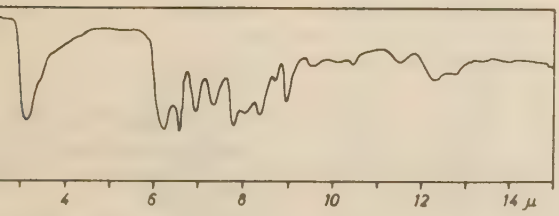
Salzsäure-Hydrolyse der Substanz

Die Substanz wurde mit n-HCl in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen 6 Stunden im Wasserbad hydrolysiert.

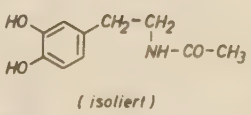
Papierchromatographische Untersuchung des Hydrolysats in Syst. 1 zeigte einen Fleck mit dem Rf 0,35, der dieselben Reaktionen wie die "0,8-Substanz" gab, aber ninhydrin-positiv war. Die papierelektrophoretische Wanderung in Phosphatpuffer von pH 6,8 geht zur Kathode (s. Abb.11c).

Durch Hydrolyse wird also eine Aminogruppierung freigesetzt. Durch Vergleich von Rf Werten in verschiedenen Systemen, Farbreaktionen, U.V.-Spektra (s.Abb.12) und elektrophoretische Eigenschaften wurde die "Rf-0,35-Substanz" als 3-Hydroxytyramin (Dopamin) identifiziert.

Die "Rf-0,8-Substanz" stellt also ein N-substituiertes Dopamin dar. Die Ähnlichkeit der Spektren von Dopamin und der "Rf-0,8-Substanz" spricht dafür, daß sich die beiden Substanzen nur in der Seitenkette unterscheiden. Das I.R.-Spektrum (s. Abb.13a) zeigt Banden bei 6,12 und 6,41, die auf ein monosubstituiertes Säureamid hinweisen. Die Isolierung eines N-Acetyl Derivates des Tyramins aus Bombyx mori (86, 87) und eines N-acetyldopamin-4-O-ß-glucosids aus Drosophila



a)



(isoliert)

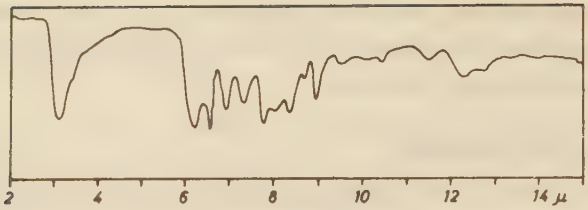


Abb.13. I.R. Spektra a) von "0,8-Substanz"
b) von N-Acetyldopamin

melanogaster läßt vermuten, daß die "Rf-0,8-Substanz" N-Acetyldopamin ist.

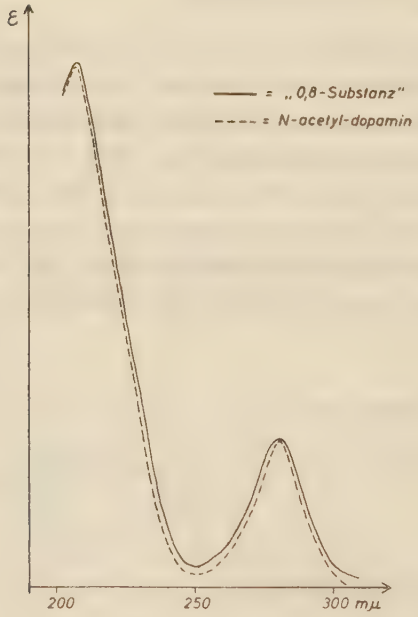


Abb.14.
U.V.-Spectra von
"0,8-Substanz ———
und von
N-Acetyldopamin ---

Zum Vergleich wurde N-Acetyldopamin aus Dopamin durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid synthetisch hergestellt (s.Exp.Teil). Die so erhaltene Verbindung zeigte dieselben Rf-Werte in verschiedenen Systemen, dieselben Farbreaktionen, dasselbe U.V.- (s. Abb.14) und I.R.-Spektrum (s. Abb.13b) wie die isolierte "0,8-Substanz".

Damit ist die "Rf-0,8-Substanz" als N-Acetyl-dopamin identifiziert.

2. Identifizierung des N-acetyldopamins als Sklerotisierungssubstanz

Der Nachweis, daß N-acetyl-dopamin beim Sklerotisierungsprozeß der Insektencuticula eine Rolle spielt, wurde durch radioaktiv markiertes N-acetyl-dopamin erbracht. Die Substanz

Nr.	Wiedergefund. Aktivität %	Proz.Verteilung d. Aktivität		Spezifische Aktivität		Injizierte Impulse
		Puparium	Körper	Puparium	Körper	
1.	63	70,6	29,4	325	46	2.000
2.	48	75,0	25,0	189	26	"
3.	26,7	78,9	21,1	124	11	"
4.	39,4	66,1	33,9	158	25	"
	44,2	72,0	28,0	199	25	
5.	39,8	64,4	35,5	239	31	2.800
6.	43,2	63,8	36,2	258	36	"
7.	39,6	69,6	30,4	258	24	"
8.	46,3	40,2	59,9	196	66	"
	42,3	59,9	40,1	237	39	
9.	43,3	58,6	41,3	475	77	5.600
10.	50,2	46,2	53,7	420	138	"
11.	41,8	68,0	32,0	457	64	"
	45,2	56,9	43,0	450	93	

Tab.1. Einbau-Versuche von N-acetyldopamin

wurde den Calliphoralarven kurz vor der Verpuppung injiziert und die Verteilung der Aktivität auf Puparium und Puppenkörper 24 Stunden nach der Verpuppung durch Naßverbrennungen nach Folsch-van Slyke und Messung des Bariumkarbonates bestimmt.

Von Substanzen, die bei der Sklerotisierung eine Rolle spielen, darf man erwarten, daß sie vorwiegend in die Cuticula eingebaut werden.

In 3 Versuchsreihen wurden jeweils 2000, 2800 bzw. 5600 cnts/min 2'C^{14}-N-acetyldopamin pro Tier injiziert. Die Ergebnisse sind in Tab.1 zusammengefaßt.

Aus den Versuchen geht hervor, daß im Durchschnitt insgesamt 43 % der injizierten Aktivität wiedergefunden werden, davon 62,6 % im Puparium und 37,3 % im Puppenkörper. Das N-Acetyl-dopamin wird also vorwiegend in die Cuticula eingebaut. Ein weiterer Beweis für den Einbau der Substanz ist der starke Abfall des N-Acetyl-dopamin-Gehaltes im Larvenkörper während der Verpuppung (s. Abb.15).

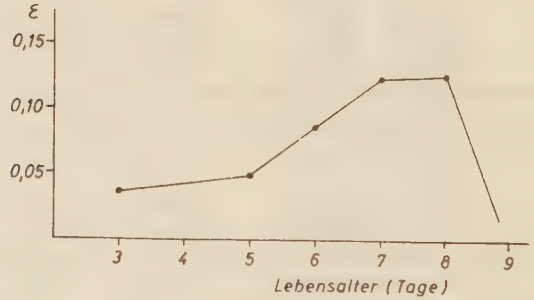


Abb.15. N-Acetyl-dopamin-Gehalt in Abhängigkeit vom Larvenalter

Auch das Schicksal der nicht eingebauten Substanz wurde untersucht.

Einen Tag alte Puppen, die 24 Stunden vor der Verpuppung mit aktivem N-Acetyl-dopamin injiziert worden waren, wurden in 80%igem Methanol homogenisiert und das Homogenat (s.Exp. Teil) in Syst.1 papierchromatographiert.

Die auf dem Chromatogramm gemessene Aktivität zeigt die Abb.16.

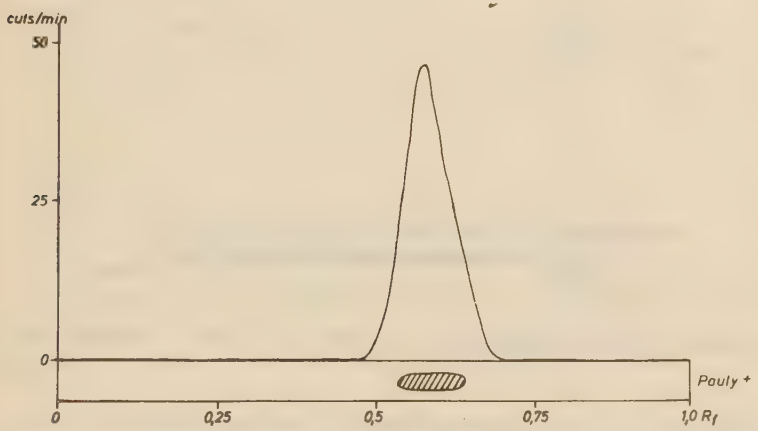


Abb.16. Umwandlung von N-acetyldopamin zu der "0,5-Substanz"

Die Aktivität wurde auf einer Substanz mit dem Rf-Wert 0,5 gefunden. Die Substanz zeigte folgende Farbreaktionen:

mit Pauly's Reagenz	-	orange,
mit Kaliumferricyanid	-	keine Reaktion u.
mit ammon. Silbernitrat	-	keine Reaktion,

was auf Verlust bzw. Maskierung einer OH-Gruppierung hindeutet.

Salzsäure-Hydrolyse der 0,5-Substanz

Nach sechsstündiger Hydrolyse dieser Substanz mit n-HCl in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen wurde papierchromatographisch eine Pauly-positive Substanz mit dem Rf 0,35 gefunden, die als Dopamin identifiziert wurde und die die gesamte Aktivität enthielt (s. Abb.17).

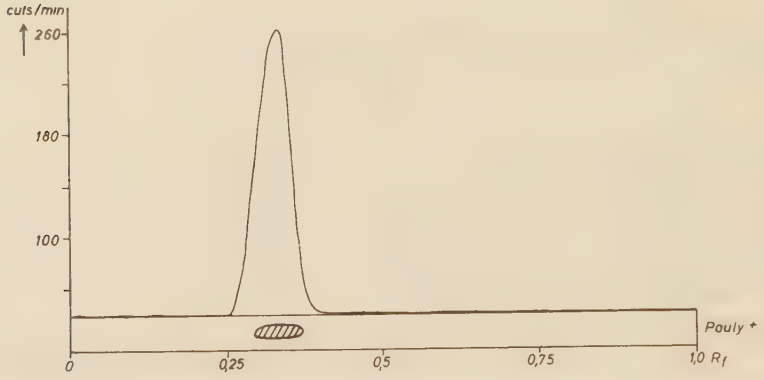


Abb.17. Salzsäure-Hydrolyse der "0,5-Substanz" (6 Std. Chromatogramm)

Daneben wurde eine andere Substanz mit dem Rf 0,18 nachgewiesen, die ammoniakkalisches Silbernitrat reduzierte und eine positive Zucker-Reaktion ergab (mit Anilinhydrogenphthalat = braun, mit $KMnO_4$-K_2CO_3-Reagenz = gelb). Durch Vergleich von Rf-Werten in verschiedenen Systemen erwies sie sich als Glucose.

Nach partieller Hydrolyse (2,5 Stunden) konnten N-acetyldopamin und Dopamin (s. Abb.18) und Glucose identifiziert werden.

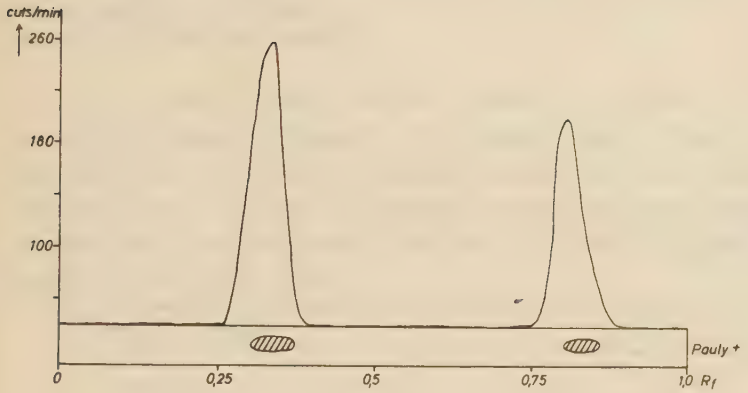


Abb.18. Salzsäure-Hydrolyse der 0,5-Substanz (2,5 Std.-Chromatogramm)

Es handelt sich also um das O-Glucosid von N-acetyldopamin.

Nach Entwicklung des Chromatogramms mit 2,6-dichlorochinonchloroimid zeigte die Substanz eine blau-violette Farbe. Das deutet auf ein p-unsubstituiertes Phenol hin. Es sollte also das Hydroxyl in Stellung 3 frei bzw. das in Stellung 4 mit Glucose gebunden sein.

Spaltung mit β-Glucosidase

Nach einstündiger Incubation der Substanz in Acetatpuffer, pH 5,6, mit 3 mg β-Glucosidase bei 29° zeigte sich eine Spaltung zum Zucker und N-acetyldopamin (s. Abb.19).

Es handelt sich also um ein β-Glucosid.

Das Glucosid ist in 5-6 Tage alten Tieren nur in kleinen Mengen zu finden. Die Menge der Substanz nimmt während der Entwicklung bis zur Verpuppung hin zu (s. Abb.20).

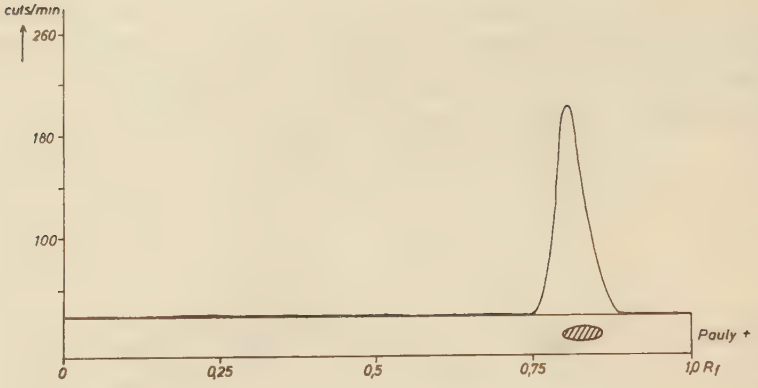


Abb.19. Enzymatische Spaltung der "0,5-Substanz" mit β-Glucosidase (Chromatogramm)

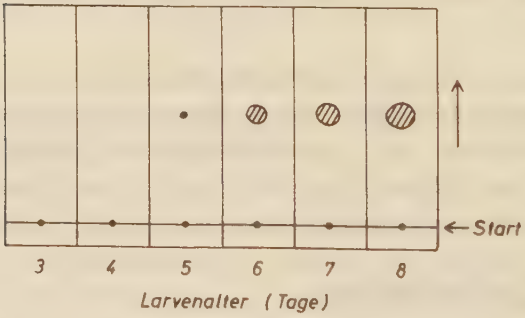


Abb.20. Gehalt von N-acetyldopamin-glucosid in verschiedenen Altersstufen (Chromatogramm)

3. Beweis für die Entstehung der Sklerotisierungssubstanz aus Tyrosin

Zur Klärung dieses Problems wurde in 7 Tage alte Tiere aktives Tyrosin injiziert, 24 Stunden später wurde ein methanolischer Extrakt aus 5 Tieren hergestellt und papierchromatographiert. Die Aktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm erwies den Übergang des Tyrosins in N-acetyldopamin und sein O-Glucosid (s. Abb.21).

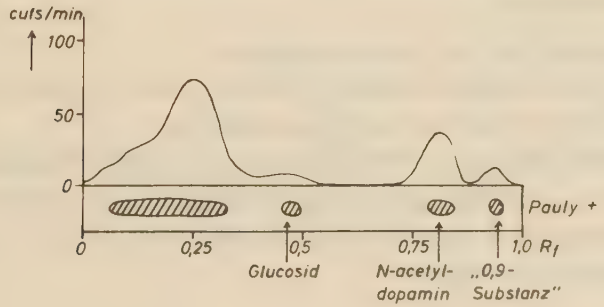


Abb.21. Umwandlungen von aktivem Tyrosin in 7 Tage alten Calliphoralarven

4. Der Stoffwechsel des Tyrosins in den verschiedenen Larvenstadien

Der genetische Zusammenhang zwischen Tyrosin und N-acetyldopamin wurde durch die beschriebenen Injektionsversuche gesichert (Abb.19). Danach lag es nahe, die Ursache für die Änderung des N-acetyldopamingehaltes während der Larvenentwicklung und die rasche Zunahme dieser Substanz vor der Verpup-

pung in einer entsprechenden Veränderung des Tyrosinstoffwechsels zu suchen.

Zur Aufklärung dieses Problems wurden 3 Methoden verwendet:

a) Enzymatische Methoden:
Homogenate von Calliphoralarven wurden mit Substrat inkubiert und das Reaktionsgemisch untersucht.

b) Injektion von radioaktiv markierten Substanzen:
Radioaktives Tyrosin sowie Substanzen, die potentielle Metaboliten desselben darstellen, wurden in Tiere injiziert und die Verteilung der Aktivität papierchromatographisch untersucht.

c) Einbauversuche an der Puppenkutikula:
Diese Methode diente speziell für die Erforschung der Biosynthese der Sklerotisierungssubstanz.
Verbindungen, die als Vorstufen von N-acetyldopamin in Frage kommen, wurden in vor der Verpuppung stehende Larven injiziert und die Verteilung zwischen Kutikula und Puppenkörper untersucht.

a) Enzymatische Methoden

Als Enzympräparate wurden Homogenate von 3-8 Tage alten Larven verwendet, die zur Hemmung der Tyrosinase mit Ascorbinsäure versetzt worden waren. Diese wurden in offenen Erlenmeyerkolben mit Substrat inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde papierchromatographisch untersucht und die Umwandlungsprodukte durch Farbreaktionen, Rf-Werte in verschiedenen Systemen, elektrophoretische Wanderungen und U.V.-Spektra identifiziert.

Inkubation mit undialysiertem Homogenat von 3-6 Tage alten Tieren

Die Inkubation mit Tyrosin ergab als Hauptumwandlungsprodukt eine Substanz mit dem Rf-Wert 0,9 (Syst.1), sie erwies

sich als p-Hydroxyphenylessigsäure. Daneben wurden kleine Mengen zweier weiterer diazo-positiver Substanzen mit den Rf-Werten 0,5 und 0,75 festgestellt (s. Abb.22 A).

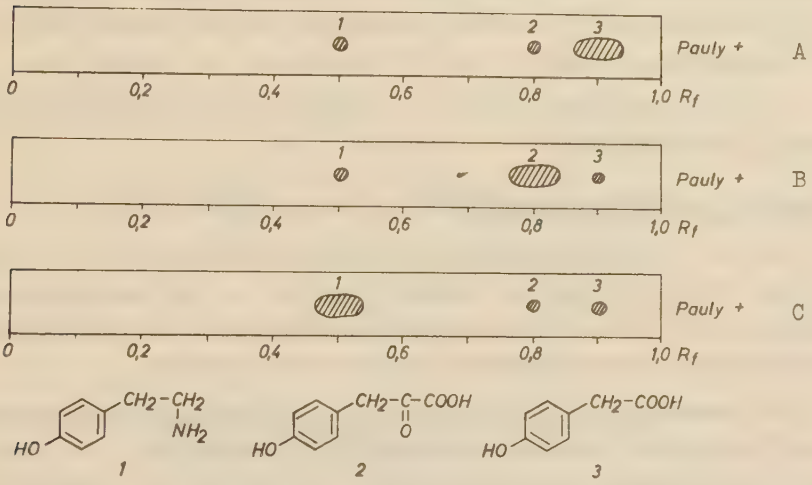


Abb.22. A. Umwandlungen von Tyrosin mit undialysiertem Homogenat von 3-6 Tage alten Larven
B. dasselbe mit dialysiertem Homogenat
C. Umwandlungen von Tyrosin mit undialysiertem Homogenat von 7-8 Tage alten Larven
(Chromatogramme)

Inkubationen mit dialysiertem Homogenat von 3-6 Tage alten Tieren

Das Larven-Homogenat wurde gegen Phosphatpuffer dialysiert.

Die Inkubation des dialysierten Homogenats mit Tyrosin zeigte fast keine Umwandlung des Substrats. Nur Spuren von p-Hydroxyphenylessigsäure und der 0,75-Substanz wurden gefunden.

Ein Zusatz von α-Ketoglutarsäure zum Homogenat verändert seine Wirkung nicht. Nach Zugabe von Pyridoxalphosphat tritt die 0,5-Substanz zusätzlich auf.

Wird der Inkubation Pyridoxalphosphat und α-Ketoglutarsäure zugesetzt, so tritt als Hauptumwandlungsprodukt die 0,75-Substanz auf, daneben erscheinen kleine Mengen von p-Hydroxyphenylessigsäure und 0,5-Substanz (s. Abb.22 B).

Die 0,75-Substanz wurde als p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure identifiziert.

Nachweis von Glutaminsäure

Auf den Chromatogrammen der Reaktionsgemische war mit Ninhydrin eine Substanz mit dem Rf-Wert 0,1 - 0,2 nachweisbar. Diese konnte durch Vergleichschromatographie in verschiedenen Systemen als Glutaminsäure identifiziert werden.

Die Umwandlung von Tyrosin zu p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure ist eine typische Transaminierungsreaktion, bei der Pyridoxalphosphat das notwendige Coenzym ist und α-Ketoglutarat als Aminogruppenakzeptor dient. Verwendet man undialysiertes Homogenat, dann läuft die Reaktion zur p-Hydroxyphenylessigsäure weiter, die in diesem Falle als Hauptumwandlungsprodukt hervortritt.

Ultrazentrifugation des dialysierten Homogenats

Das dialysierte Homogenat wurde in der Spinco-Ultra-Zentrifuge 1 1/2 Stunden bei 25000 U/Min. zentrifugiert und der Überstand mit einem Gemisch aus inaktivem und C^{14}-markiertem Tyrosin inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch papierchromatographiert und die Aktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm gemessen. Das Ergebnis gibt die Abb.23 wieder.

Der Niederschlag wurde in eiskaltem Phosphatpuffer suspendiert und in derselben Weise wie der Überstand auf Enzymaktivität getestet. Abb.24 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

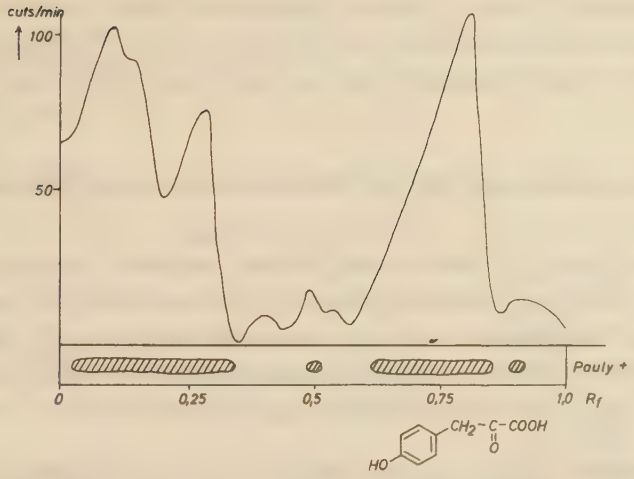


Abb.23. Radiochromatogramm des Incubations-gemisches mit Enzym-Überstand

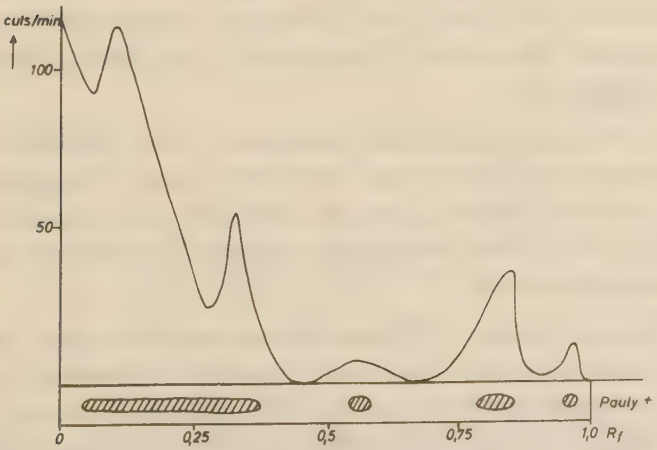


Abb.24. Radiochromatogramm des Incubations-gemisches mit Enzym-Niederschlag

Beim Vergleich dieser beiden Enzymfraktionen fällt auf, daß die Transaminaseaktivität hauptsächlich im Überstand gefunden wird, diese Transaminase ist also ein lösliches Enzym.

Inkubation mit undialysiertem Homogenat von 7-8 Tage alten Tieren

Homogenate von 7-8 Tage alten Tieren wandeln Tyrosin nur in geringem Maße in p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure und p-Hydroxyphenyl-essigsäure um. Als Hauptmetabolit wurde die durch den Rf-Wert 0,5 (Syst.1) charakterisierte Substanz gefunden, die sich als Tyramin erwies (s. Abb.22 C).

Inkubationen mit dialysiertem Homogenat von 7-8 Tage alten Tieren

Die Inkubation mit dialysiertem Homogenat allein zeigte keine Umwandlung des Tyrosins.

Nach Zusatz von Pyridoxalphosphat tritt wieder Tyrosin als Umwandlungsprodukt auf. Der Abbau von Tyrosin zu Tyramin in Calliphoralarven ist also eine Decarboxylierungsreaktion, die - ebenso wie in anderen Organismen - Pyridoxalphosphat als Coenzym benötigt.

Die kurz vor der Verpuppung stehenden Tiere zeigen demnach eine tiefgreifende Veränderung ihres Tyrosinstoffwechsels. Statt der Transaminierung, die den Hauptweg der jüngeren Tiere darstellt, tritt die Decarboxylierung als vorherrschende Umwandlungsreaktion auf.

Die Bedeutung dieser Stoffwechselumsteuerung wird später diskutiert werden. Einen Überblick über die Abbauwege des Tyrosins in Abhängigkeit vom Larvenalter gibt das Schema der Abb.25. Es zeigt die Aktivitätsverteilung in Chromatogrammen von C^{14}-Tyrosin-Inkubationen.

b) Injektion von radioaktiv markierten Substanzen

Markiertes Tyrosin bzw. potentielle Tyrosinmetaboliten

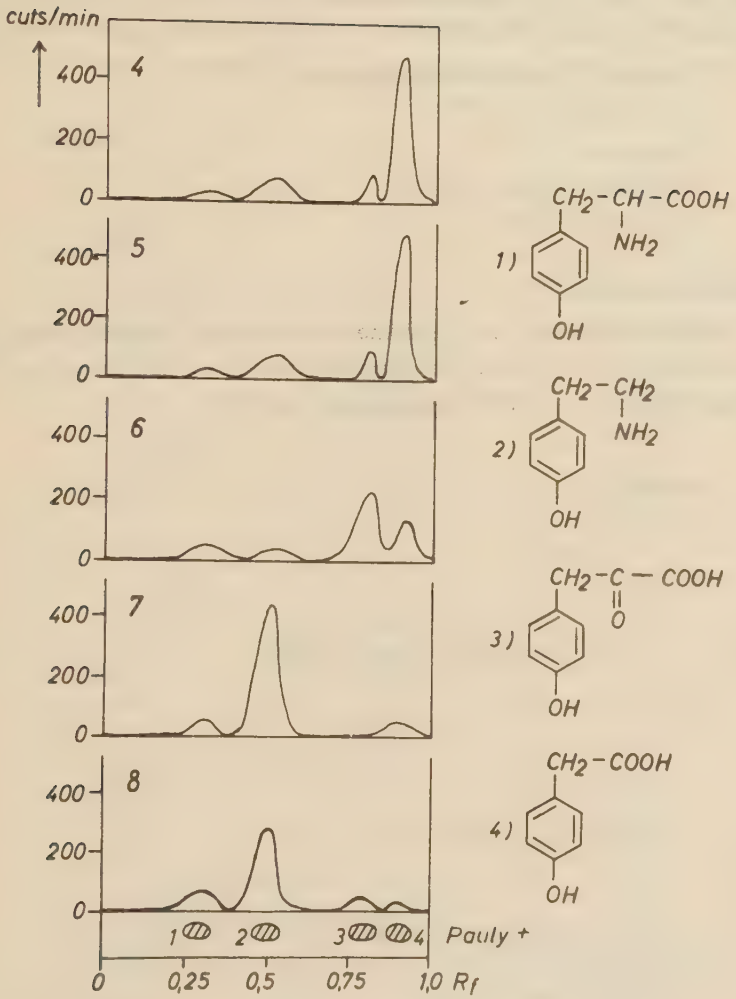


Abb.25. Übersicht über die Umwandlungen von Tyrosin in 4-8 Tage alten Tieren (Radiochromatogramme)

wurden 3-8 Tage alten Tieren injiziert. Nach 24 Stunden wurden methanolische Extrakte von jeweils 5 Tieren je Alters-

stufe papierchromatographiert (Syst.1) und die Aktivitätsverteilung auf den Chromatogrammen gemessen. Die injizierten Substanzen waren die folgenden:

generell markiertes Tyrosin (C^{14}),
D-, L-Dopa-2-C^{14},
Dopamin-2'-C^{14},
N-acetyldopamin-2'-C^{14} und
Tyramin-2'-C^{14}.

Tyrosininjektionen

In jüngeren Larven tritt keine auffällige Veränderung des injizierten Tyrosins ein. Die Injektionen in 6-8 Tage alte Tiere ergeben das in Abb.26 dargestellte Bild.

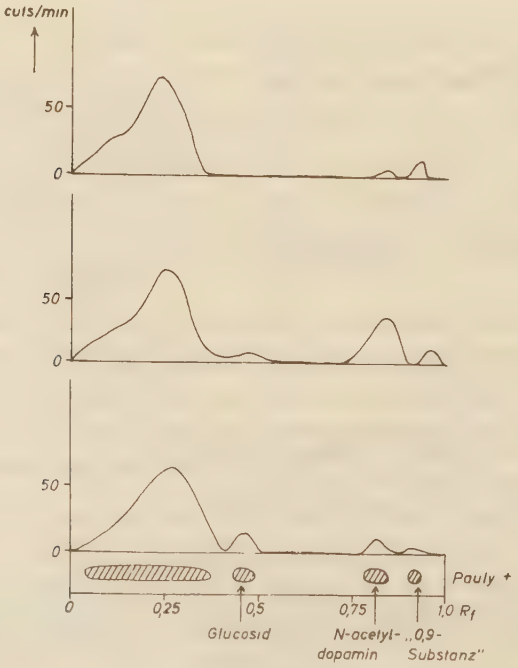


Abb.26. Umwandlungen von injiziertem C^{14}-Tyrosin in 6, 7 und 8 Tage alten Tieren (Radiochromatogramme)

Das umgewandelte Tyrosin ist hauptsächlich als N-acetyl-dopamin bzw. dessen Glykosid zu finden. Daneben tritt in kleinerer Menge ein weiterer Metabolit mit dem Rf-Wert 0,9 auf. Da in dem verwendeten Chromatographiesystem Tyrosin eine

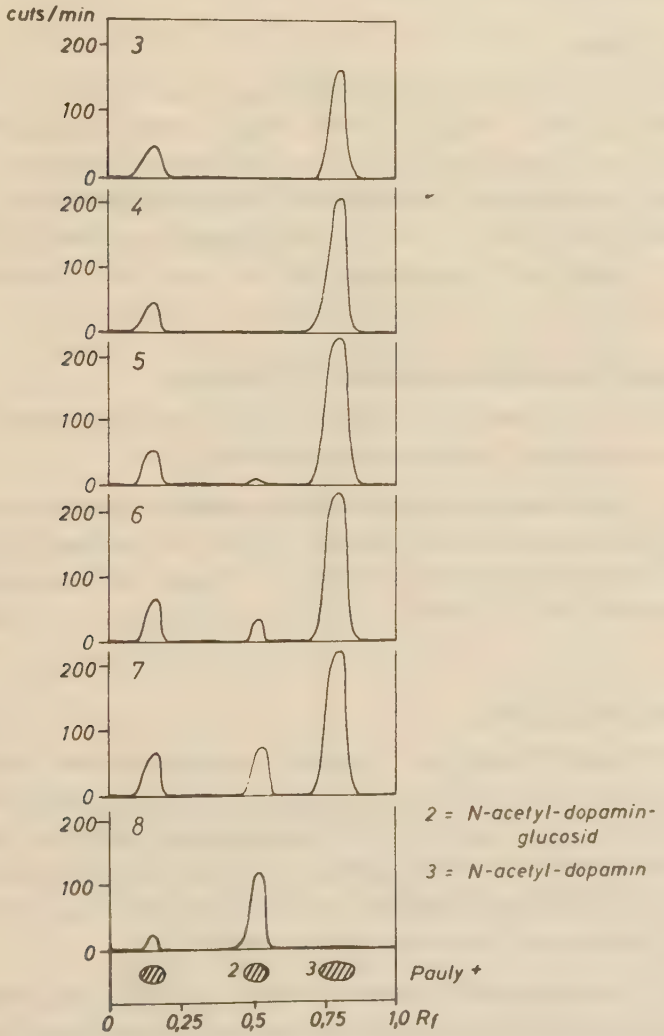


Abb.27. Übersicht über die Umwandlungen von Dopa in 3-8 Tage alten Tieren anhand der Radiochromatogramme

sehr breite und unscharfe Bande liefert, können evtl. vorhandene kurzlaufende Tyrosinmetaboliten nicht erkannt werden. Mit Butanol-HCl läßt sich eine geringe Menge eines noch nicht identifizierten Umwandlungsproduktes abtrennen (KARLSON und AMMON, unveröffentlicht) (89).

Dopainjektionen

Aus der Abb.27 gehen die Umwandlungen von Dopa in 3-8 Tage alten Larven hervor. Schon in drei Tage alten Tieren wird der größte Teil der Aktivität im N-acetyl-dopamin gefunden. Die mit 5 Tagen injizierten Tiere bauen einen kleinen Teil der injizierten Aktivität in das N-acetyldopamin-glykosid ein. Dieser Anteil nimmt zur Verpuppung hin zu, nach der Verpuppung ist die Aktivität nur noch im Glykosid zu finden.

Injektionen von Dopamin und N-acetyldopamin

Für die Injektionen von Dopamin und N-acetyldopamin zeigt Abb.28 die erhaltene Aktivitätsverteilung.

Dopamin und N-acetyldopamin zeigen genau dasselbe Umwandlungsbild wie Dopa. Aktives Dopamin tritt in keinem Fall frei auf. Nach Dopamininjektionen tritt in jüngeren Tieren eine aktive Substanz vom Rf-Wert 0,2 auf, die noch nicht bekannt ist.

Injektionen von Tyramin

Die nach Injektionen von Tyramin wiedergefundene Aktivität ist sehr gering, was auf eine Abspaltung der Seitenkette schließen läßt. Der geringe Betrag wiedergefundener Aktivität verteilt sich auf N-acetyldopamin, was auf eine Hydroxylierung von Tyramin zu Dopamin deutet, und auf die auch nach Tyrosininjektion gefundene Substanz des Rf-Wertes 0,9.

Aus den beschriebenen Versuchen geht hervor, daß Dopa und Dopamin Zwischenstufen des Hauptumwandlungsweges von Tyrosin zu N-acetyldopamin sind. Ein kleiner Teil des Tyrosins wird über Tyramin diesem enzymatischen Prozeß zugeführt.

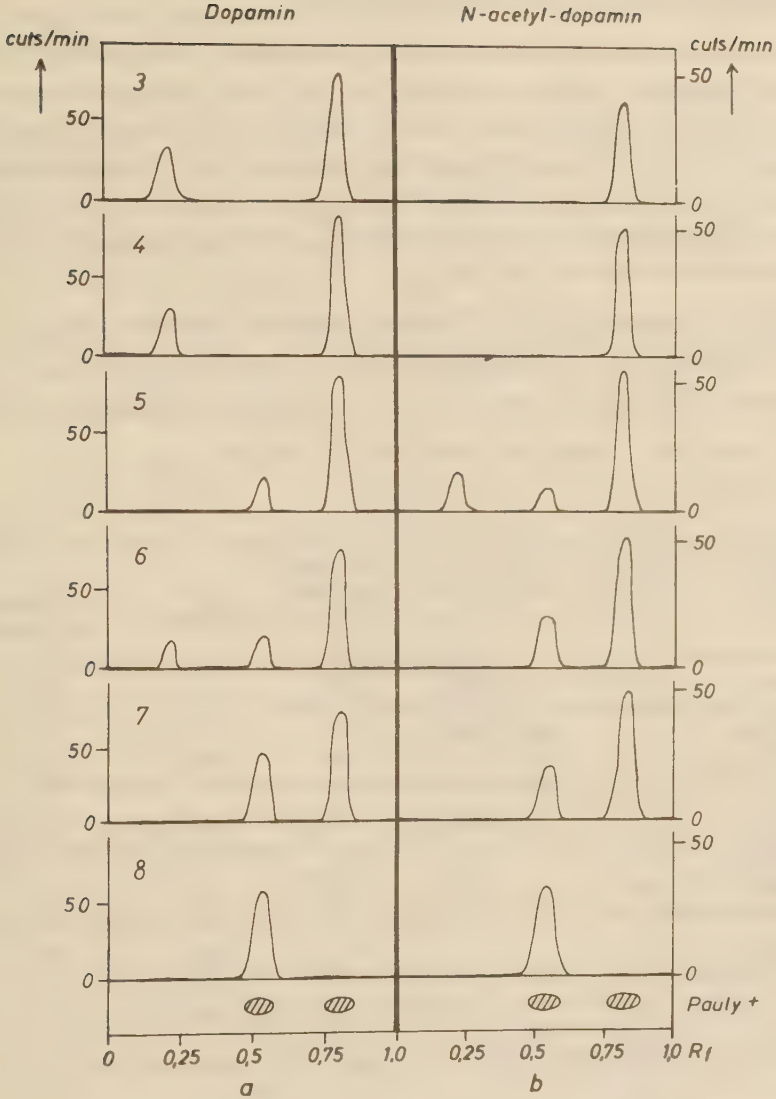


Abb.28. Übersicht über die Umwandlungen von (a) Dopamin und (b) N-acetyldopamin in 3-8 Tage alten Larven anhand der Radiochromatogramme

c) Einbauversuche an der Puppencuticula

Es wurden Verbindungen, die als Vorstufen von N-acetyldopamin vermutet werden konnten, in vor der Verpuppung stehende Larven injiziert und nach Abschluß des Puparisierungsvorganges die Verteilung zwischen Cuticula und Puppenkörper untersucht. Die bei der Umwandlung von Tyrosin zu N-acetyldopamin auftretenden Zwischenprodukte sollten vorwiegend in die Cuticula eingebaut werden.

Injiziert wurden 2'-C^{14}-Tyramin, generell markiertes N-acetyltyramin, 2'-C^{14}-Dopamin und 2'-C^{14}-N-acetyldopamin.

Tyrosin und Dopa wurden schon von KARLSON untersucht (81).

Die Tabelle 2 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

Injizierte Substanz	Nr. Versuche	Injizierte Aktivität (cnts.)	Wiedergefund. Aktivit. %	% Cuticula	% Puppenkörper
Dopamin	6	6.600	52	66,5	33,5
N-acetyl-Dopamin	11	2000,2800 bzw.5.600	43	62,6	37,3
Tyramin	8	8.400	21,4	27,2	72,3
N-acetyl-tyramin	10	1.785	23	23,3	76,7
Tyrosin	-	-	-	80	20
Dopa	-	-	-	80	20

Tabelle 2. Einbauversuche von Tyrosin und Tyrosinmetaboliten

Aus diesen geht hervor, daß Tyramin und N-acetyltyramin nur zu 25 % in die Puppencuticula eingebaut werden, während

die Aktivität von Dopamin und N-acetyldopamin zu über 60 % im Puppentönnchen wiedergefunden wird. Auch die Hauptmenge von Tyrosin bzw. Dopa geht in die Cuticula über.

Auf Grund dieser Befunde kann man Dopa und Dopamin als die wesentlichen Zwischenstufen der N-acetyldopaminbildung betrachten, Tyramin und N-acetyltyramin sind demgegenüber von untergeordneter Bedeutung. Die kleine Menge von eingebautem Tyramin und N-acetyltyramin ist durch Hydroxylierung zu Dopamin und N-acetyldopamin zu erklären.

Kombiniert man die Ergebnisse der erwähnten Versuche, dann kann man folgendes Schema der Umwandlungen von Tyrosin aufstellen (Abb.29):

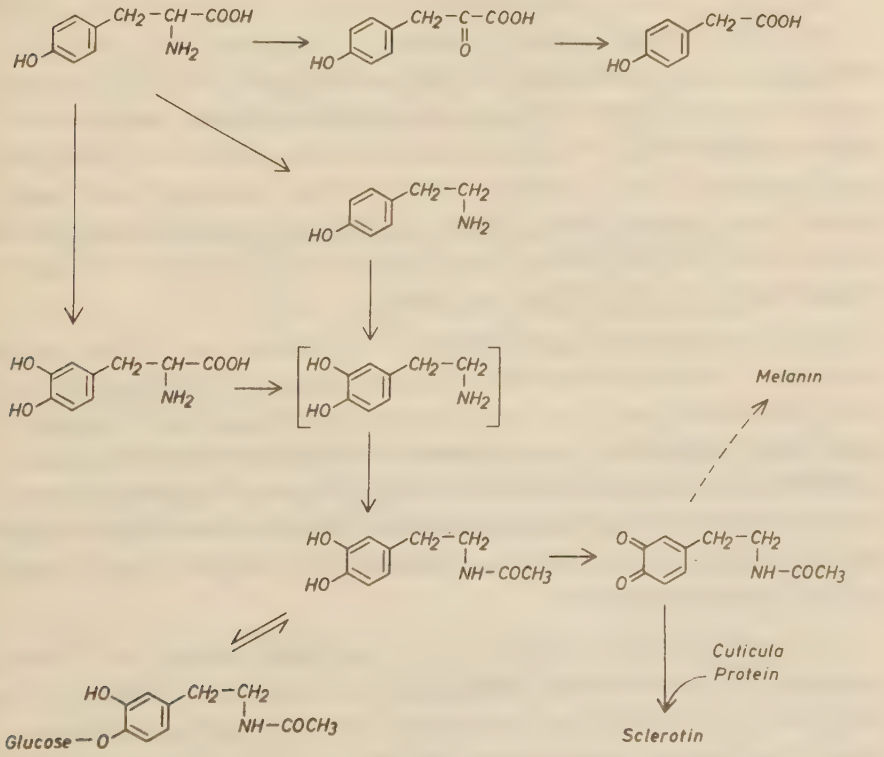


Abb.29. Schema des Tyrosinstoffwechsels von Calliphora

5. Einfluß von Hormon auf die enzymatischen Vorgänge

Die Sklerotisierung der Insekten wird durch das Hormon der Prothorakaldrüse ausgelöst. Nach seiner Einwirkung treten im larvalen Organismus diejenigen Prozesse, die zur Sklerotisierung führen, auf. Einer von diesen ist der Einbau von Tyrosin in die Cuticula. Er steht in quantitativer Beziehung zur Konzentration des Hormons.

Auch die vor der Verpuppung stattfindende Aktivierung des Phenoloxydasesystems, die die Bildung der Sklerotisierungschinone verursacht, ist von KARLSON und SCHWEIGER (85) als Ecdyson-abhängiger Vorgang nachgewiesen worden.

Durch die oben geschilderten Versuche ist eine Umsteuerung des Tyrosinstoffwechsels in Larven des späten III. Stadiums bewiesen. Dabei wird ein Weg begünstigt, der zur Biosynthese einer wichtigen Sklerotisierungssubstanz führt. Das hat die Frage aufgeworfen, ob dieser Umsteuerung auch eine Hormonwirkung zugrunde liegt. Dieses Problem wurde zunächst auf indirektem Wege angegriffen: Tiere, deren natürliche Hormonversorgung durch eine Schnürung unterbunden war, wurden auf ihre enzymatischen Aktivitäten untersucht.

Um einen frühzeitigen Einfluß von Ecdyson möglichst auszuschließen, wurden 6 Tage alte Tiere geschnürt. 12 bzw. 48 Std. nach der Verpuppung des vor der Ligatur liegenden Körperabschnittes wurden von einer Anzahl von Tieren die Abdomines abgetrennt, homogenisiert und die Homogenate nach Inkubation mit Tyrosin (Gemisch von markiertem und inaktivem) auf ihre enzymatischen Aktivitäten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb.30 zusammengestellt.

Man sieht daraus deutlich, daß die Umsteuerung von Transaminierung zu Decarboxylierung nur in einem sehr viel geringeren Maße stattfindet als beim normalen Verlauf der Entwicklung. Die dennoch erkennbare Zunahme der Decarboxylase-Aktivität dürfte auf die frühe Ausschüttung kleinerer Ecdysonmengen

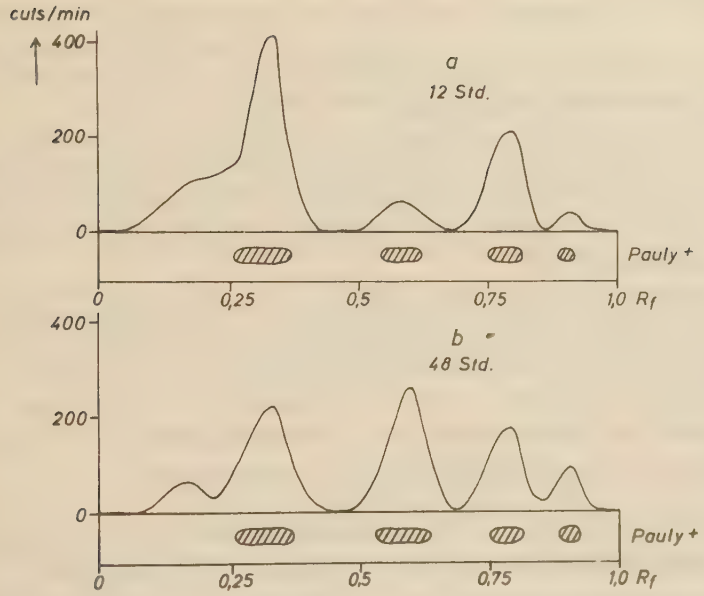


Abb.30. Umwandlungen von Tyrosin in geschnürten Larven
(a) 12 Std.
(b) 48 Std. nach Verpuppung des Kopfes

zurückzuführen sein.

Daß injiziertes Tyrosin insgesamt zu einem sehr viel geringeren Prozentsatz umgewandelt wird als bei nicht geschnürten Tieren, läßt auf eine Schädigung des ganzen Enzymgefüges durch den Eingriff schließen.

III. DISKUSSION

Die geschilderten experimentellen Befunde gestatten es, zu folgenden drei Fragestellungen Beiträge zu liefern:

1.) Unterscheidet sich der Tyrosinstoffwechsel der Wirbeltiere in charakteristischer Weise von dem der Arthropoden und mit welchen biologischen Funktionen steht dies in Zusammenhang?

2.) Durch welche Tyrosin-Metaboliten ist die Sklerotisierung, ein den Arthropoden eigentümlicher Prozeß, bedingt?

3.) Wie ist die Umsteuerung des Tyrosinstoffwechsels im späten dritten Larvenstadium zu verstehen?

Zu 1.: Der Vergleich des Tyrosinstoffwechsels von Calliphora mit dem anderer Organismen zeigt manche Ähnlichkeiten: Aminosäure-Decarboxylierungen und -Transaminierungen stellen allgemeine Reaktionen dar, die in vielen Tier- und Pflanzenarten aufgefunden wurden. Ihr Nachweis im Stoffwechsel der Insekten erhärtet die Anschauung, daß Stoffwechselreaktionen in allen Organismen nach den gleichen Prinzipien verlaufen. Der Unterschied in den Endprodukten beruht mehr auf dem Vorhandensein bzw. Fehlen einzelner Enzyme und damit Reaktionsschritte, als auf einem völlig anderen Reaktionsprinzip. Zu den Stoffwechselprodukten von Tyrosin gehören die pharmakologisch hochwirksamen "Catecholamine" Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin. Ihr Vorkommen in Insekten ist schon früher nachgewiesen worden (90). Jedoch war über die physiologische Bedeutung dieser Substanzen wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein bisher unbekanntes Catecholamin, das N-acetyldopamin, nachgewiesen und seine Biosynthese geklärt. Sie erfolgt in ähnlicher Weise wie die der Catecholamine in Wirbeltieren. Bei Vertebraten wirken diese Substanzen als Hormone; bei Calliphora dient N-acetyldopamin als Sklerotisierungssubstanz, wie

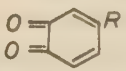
unten näher ausgeführt wird. Vergleichbare Stoffwechselreaktionen führen also zu ähnlichen Produkten, die aber verschiedene Funktionen besitzen.

Zu 2.: Die Injektionsversuche mit radioaktivem Tyrosin zeigen, daß die größte Menge des umgewandelten Tyrosins zu N-acetyldopamin und seinem Glykosid verarbeitet wird. Das spricht dafür, daß N-acetyldopamin die wichtigste, wenn nicht die einzige Sklerotisierungssubstanz der Calliphora ist.

Der Nichteinbau von Tyrosin im Falle des Ecdysonmangels und das gleichzeitige Ausbleiben der Stoffwechselumsteuerung im Sinne der N-acetyldopaminbildung weisen darauf hin, daß Tyrosin nur in umgewandelter Form in die Cuticula eingebaut wird.

Ein anderer experimenteller Befund erhärtet diese Anschauung: Kurz vor der Verpuppung in Calliphoralarven injiziertes radioaktives Tyrosin findet man in den Hydrolysaten der Puparriumproteine nicht wieder.

Nach der schon erwähnten Theorie sind Chinone des Types



die sich aus den entsprechenden Diphenolen ableiten, für die Sklerotisierung verantwortlich. Als o-Diphenol könnte N-acetyldopamin - nach Oxydation zum Chinon - mit den Cuticulaproteinen in der angedeuteten Weise reagieren. Zwar haben die Isolierung von Phenolkarbonsäuren aus Cuticula und die Identifizierung der Protocatechussäure als Sklerotisierungssubstanz der Ootheca von Blatta (97) zu der Anschauung geführt, daß nur desaminierte Dopaderivate diese Funktionen besitzen. Dies gilt jedoch nicht uneingeschränkt, wie durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt wird.

Von KARLSON und LIEBAU (48) wurde nachgewiesen, daß N-acetyldopamin ein gutes Substrat für die Phenoloxydase von Calliphora ist. Das Schicksal der N-acetylgruppierung ist unbekannt. Ein acetyliertes Dopamin kann zum Indol-5,6-chinon

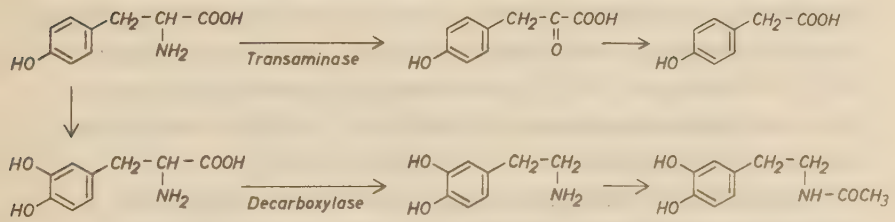
und zu Melanin umgewandelt werden. Es ist denkbar, daß die N-acetylgruppierung eine Cyclisierung des o-Chinons zum Indol verhindert und dadurch das solchermaßen geschützte Dopamin für die Sklerotisierung erhält. Sklerotisierung und Melanisierung in Calliphora sind damit getrennte Prozesse, obwohl sie auf die Oxydation ein und derselben Substanz zurückzuführen sind.

Das N-acetyldopamin-glukosid wurde in der Mutante "claret" von Drosophila melanogaster erstmalig nachgewiesen (OKUBO, 88): sein Vorkommen bei Calliphoralarven steht in zeitlichem Zusammenhang mit der Verpuppung und gibt einige Anhaltspunkte für die Bedeutung des Glukosids. Es tritt in 5-6 Tage alten Larven in kleiner Menge auf, wird bis zur Verpuppung vermehrt und konnte auch in den Puppen selbst nachgewiesen werden. Diese Befunde können so gedeutet werden, daß das Glykosid als Speicherform des N-acetyldopamins für die Dauer der Puppenruhe dient und in Zusammenhang mit danach auftretenden Sklerotisierungsvorgängen wieder gespalten und damit reaktiviert werden kann. Eine Parallele hierzu ist das Vorkommen des Glukosids der Protocatechussäure in der linken Anhangdrüse des weiblichen Geschlechtsapparates von Blatta. Auch hier wird das Phenol durch die Glykosidbindung dem Angriff der Phenoloxydase zunächst entzogen; erst durch die enzymatische Hydrolyse wird das sklerotisierende Agens freigesetzt.

Veränderungen des enzymatischen Gefüges im Laufe der Entwicklung sind ein allgemein verbreitetes Phänomen, das besonders augenfällig in entwicklungsphysiologischen Übergangsstadien zu beobachten ist. In manchen Fällen äußert sich dies im Auftreten von Enzymen, die zur Umwandlung von Nahrungsstoffen notwendig sind, oder von Enzymsystemen, die neue Wege der Entgiftung und Exkretion eröffnen (BROWN (92), PAIK (93), METZENBERG (94)).

In anderen Fällen werden Fermente gebildet oder aktiviert, die für die Synthese biologisch wichtiger Substanzen erfor-

derlich sind. Ein Beispiel hierfür wurde in vorliegender Arbeit aufgefunden: Bei Calliphora wird während des Überganges von der Larve zur Puppe in verstärktem Maße N-acetyldopamin gebildet, eine Verbindung, die für die Herstellung des Puppentönnchens außerordentlich wichtig ist. Dieser Vorgang beruht auf der Umsteuerung des Tyrosinstoffwechsels von dem Wege der Transaminierung zur p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure zu dem der Decarboxylierung zum entsprechenden Amin, wie im folgenden Schema dargestellt ist:



Die Umsteuerung ihrerseits erwies sich als abhängig von dem Häutungs- und Verpuppungs-Hormon Ecdyson und liefert somit ein Beispiel für die Regulierung von Enzymsystemen unter der Wirkung von Hormonen.

Zu 3.: In letzter Zeit haben CLEVER und KARLSON (4) eine Wirkung von Ecdyson auf die Aktivität der Genloci in den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus nachgewiesen. Die Anhäufung von RNS in der Umgebung dieser aktivierten Chromosomenabschnitte läßt nach unseren heutigen Vorstellungen über die Biochemie der Zelle auf eine Protein-Biosynthese schliessen. Im Hinblick darauf liegt es nahe, die Erklärung für die beschriebene Veränderung des Enzymspektrums in Calliphora in einer Neusynthese von Enzymprotein zu suchen.

C. EXPERIMENTELLER TEIL

I. ALLGEMEINE METHODIK

Verwendete Apparate:

Für die Aufnahme des U.V.-Spektrums
ZEISS-Spektralphotometer PMQ 11,
für die Aufnahme von IR-Spektren
PERKIN-ELMER-Spektralphotometer, Modell 21,
die Radioaktivitätsbestimmungen wurden in einem
FRIESEKE & HOEPFNER - Gerät, Modell FH 149, durchgeführt,
für die Messungen auf Plättchen mit Methandurchflußzähler,
für die Messungen auf Papierchromatogrammen mit dem
Radiopapierchromatograph FRIESEKE & HOEPFNER 7452 mit
2 Endfensterzählrohren 7 Hz, 15a.
Die papierelektrophoretischen Untersuchungen wurden in
einem selbstgebauten Gerät durchgeführt.
Die Ultrazentrifugation erfolgte in der präparativen
SPINCO-UZ.

Papierchromatographie:

Es wurde die aufsteigende Chromatographie verwendet,
als Papier diente SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 b.

Folgende Systeme wurden benutzt:

(1.) Butanol-Essigsäure-Wasser 4:1:5,
(2.) Butanol-Essigsäure-Wasser 4:1:1,
(3.) Aceton, 60 %ig,
(4.) Butanol, ges. m. N-HCl,
(5.) Butanol-Propanol-Wasser 1:2:1,
(6.) Benzin-Propionsäure-Wasser 2:2:1,
(7.) Butanol-Äthanol-Wasser-Ammoniak 45:5:49:1 und
(8.) Butanol mit 1 % Ammoniak.

Für die Entwicklung der Chromatogramme wurden folgende

Reagenzien verwendet:

(a) Diazotierte Sulfanilsäure (0,1 g Diazoniumsalz in 20 ml 10 %iger Na_2Co_3-Lösung) zum Nachweis von Phenolen, aromatischen Aminen u.a. kupplungsfähigen Substanzen,
(b) ammoniakalische Silbernitratlösung nach PARTRIDGE (95) (für reduzierende Substanzen),
(c) eine 0,25 %ige Lösung von Ninhydrin in Butanol (Nachweis von Aminogruppen),
(d) 0,1 % α-Nitroso-β-naphthol in Äthanol (f. p-substituierte Phenole) (96),
(e) 0,1 %ige Lösung von 2,6-Dichlorochinon-chloroimid in Äthanol (u.a. f. p-unsubstituierte Phenole) (97),
(f) 0,1 %ige $FeCl_3$-Lösung und
(g) FOLINs Reagenz für phenolische Substanzen,
(h) 0,44 % Kaliumferricyanid in Phosphatpuffer vom pH 7,8 (98) (für Indolring-schließende Systeme wie Catecholamin u.ä.),
(i) Anilinhydrogenphthalat (0,93 g Anilin + 1,66 g Phthalsäure in 100 ml Butanol) für Aldohexosen und Aldopentosen (99) und
(k) eine wässrige Lösung von 1 % Kaliumpermanganat und 2 % Natriumkarbonat für Zucker.

Radioaktive Substanzen:

Die folgenden radioaktiven Präparate wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, und der California Corporation for Biochemical Research bezogen:

generell markiertes C^{14}-L-Tyrosin,
2'-C^{14}-L,D-Dopa,
2'-C^{14}-Tyramin und
2'-C^{14}-Dopamin.

Generell C^{14}-markiertes N-acetyl-Tyramin wurde aus generell markiertem Tyrosin hergestellt. Hierzu wurden 0,8 mg des aktiven Tyrosin-hydrochlorids mit 12 mg inaktivem Tyrosinhydro-

chlorid und 1 g β-Naphthyl-methyläther in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen im Ölbad auf 268-270°C 8 Min. erhitzt, nach Abkühlung wurde das Gemisch mit Petroläther (K.P. 30-70°) extrahiert. Die Lösung wurde filtriert und der Rückstand mehrmals mit Petroläther gewaschen. Es wurden 7,8 mg Tyramin vom Smp. 158° erhalten (82,5 % der Theorie).

Das Tyramin wurde mit 0,5 ml Dioxan und 1 ml Isopropenylacetat 3,5 Std. auf dem Wasserbad am Rückfluß gekocht. Dioxan und nicht umgesetztes Propenylacetat wurden verdampft und der Eindampfrückstand in Cyclohexan gelöst. Nach Zusatz von 2 mg inaktivem N-acetyltyramin wurden aus der Lösung 6,3 mg Kristalle gewonnen. Umkristallisation aus Essigester-Benzol lieferte 4,03 mg reines N-acetyltyramin (Smp. 132 - 133°C). Die spezifische Aktivität des Präparates betrug 0,166 µC/mg.

2-C^{14}-N-acetyldopamin wurde aus 2-C^{14}-Dopamin hergestellt. 5µC Dopamin (spez. Akt. 1,0 mc/mM) wurden mit 7 mg inaktivem Dopaminhydrochlorid gemischt und mit 1 ml Dioxan und 3 ml Essigsäureanhydrid 1,5 Stunden am Rückfluß gekocht. Das Reaktionsgemischt wurde verdampft, der Rückstand durch 26-stündige Einwirkung von 4 ml 20%iger äthanolischer HCl bei 0°C verseift. Die Papierchromatographie zeigte eine fast völlige Umsetzung zum N-acetyldopamin. Die Lösung wurde eingedampft und in 2 ml Wasser gelöst (1 µl der Lösung - 700 cnts./Min.).

II. VERSUCHE

Isolierung von N-acetyldopamin aus Calliphoralarven

50 g 7 Tage alte Calliphoralarven wurden mit 200 ml 80%-igem Methanol homogenisiert (3 Min. Starmix) und das Homogenat 15 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Der gelbe Überstand wurde rotationsverdampft und präparativ papierchromatographiert (Syst.1). Die mit Pauly's Reagenz purpurfärbbare Substanz vom Rf-Wert 0,78 wurde mit Wasser 24 Std. bei Zimmertemperatur eluiert. Das Wasser wurde hierauf rotationsverdampft und der Rückstand im Syst.2 chromatographiert. Die Substanz zeigte nun einen Rf-Wert von 0,81, sie wurde wieder eluiert und das Eluat rotationsverdampft. Als Rückstand verblieben 11 mg Substanz.

Herstellung von N-acetyldopamin

455 mg Dopamin-hydrochlorid wurden mit 10 ml Dioxan und 12 ml Essigsäureanhydrid 3 Stunden am Rückfluß gekocht. Das Lösungsmittel wurde verdampft, der Rückstand in 5 ml 20 %iger äthanolischer HCl aufgenommen und 24 Std. im Kühlschrank aufbewahrt. Durch die Papierchromatographie wurde die weitgehende Umwandlung des völlig acetylierten Derivates zu N-acetyldopamin erwiesen. Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie über Aluminiumoxyd, Akt.-Stufe IV, gereinigt. Die Säule wurde zuerst mit Benzol-Essigester, dann mit Essigester-Methanol eluiert. Aus der Methanol-Essigester(1:7)-Fraktion wurden 320 mg N-acetyldopamin gewonnen.

Rf-Werte des N-acetyldopamin: 0,78 - 0,8 (Syst.1),
0,81 - 0,83 (Syst.2),
0,75 - 0,76 (Syst.4) u.
0,81 - 0,83 (Syst.5).

Aufnahme des IR-Spektrums:

1 mg Substanz, gelöst in 1 ml Methanol, wurde mit 350 mg Kaliumbromid gemischt und im Vakuum 24 Std. über P_2O_5 getrock-

net. Diese getrocknete Mischung wurde für die Aufnahme des Spektrums verwendet (Abb.13b).

Quantitative Bestimmung von NAD in verschieden alten Larven

Je 500 mg von 3-8 Tage alten Larven wurden mit Glashomogenator nach Potter in 10 ml 80 %igem Methanol 3 Min. homogenisiert, das Homogenat bei 3000 U/Min. 15 Min. homogenisiert und der Überstand rotationsverdampft.

Der Eindampfrückstand wurde auf 4 cm breiten Papierstreifen im Syst.1 chromatographiert, der NAD enthaltende Fleck ausgeschnitten und mit 1 ml Wasser eluiert. Dieser Lösung wurden 0,5 ml 1 %ige KH_2PO_4-Lösung und 0,5 ml 3 %ige $(NH_4)\ Mo_7\ O_{24} \cdot 4H_2O$ in 5n HCl zugefügt.

Eine Stunde später wurde nach Verdünnen mit 3 ml Wasser die Extinktion bei 350 mμ gemessen.

Nachweis von Glucose

Glucose wurde durch Vergleichschromatographie in folgenden Systemen identifiziert: Syst.1 - Rf 0,18; Syst.7 - Rf 0,1 und in Syst.8 - Rf 0,07.

Enzymatische Methoden

Herstellung des Enzympräparates

10 Tiere wurden mit 10 ml eiskaltem 1/15-m-Phosphatpuffer vom pH 7,25 unter Zusatz von 0,15 g Ascorbinsäure 1 Min. im Potter homogenisiert und das Homogenat 15 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert.

Der Überstand diente als Enzympräparat.

Dialyse

Das Enzympräparat wurde zuerst 12 Std. gegen Phosphatpuffer (pH 7-8) unter Zusatz von 5 g Ascorbinsäure, neutralisiert mit NaOH, dialysiert und danach 12 Std. gegen reinen Phosphatpuffer.

Ultrazentrifugation

10 ml des dialysierten Homogenats wurden 1 1/2 Std. in der SPINCO-Ultrazentrifuge bei 25000 U/Min. zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 5 ml eiskaltem Phosphatpuffer verteilt und 1 Min. im Potter homogenisiert.

Überstand und Niederschlag wurden getrennt getestet.

Inkubationen mit undialysiertem Homogenat

1 ml Enzym,
8,4 µMol Tyrosin u.
0,5 mg Ascorbinsäure wurden mit Phosphatpuffer (pH 7,3) auf 3 ml aufgefüllt. Bei Verwendung von markiertem Tyrosin wurden 60000 cnts. eingesetzt.

Inkubation mit dialysiertem Enzym

1 ml Enzym,
8,4 µMol Tyrosin u.
0,5 mg Ascorbinsäure,
Phosphatpuffer (7,3) auf 3 ml.

Für die Ketoglutarsäure- bzw. Pyridoxalphosphatinkubationen wurden 25 µMol des ersteren bzw. 15 γ des letzteren zugesetzt.

Alle Inkubationen wurden 24 Std. bei 34°C durchgeführt.

Identifizierung der Metaboliten

Identifizierung von p-Hydroxyphenylessigsäure

Die nach Inkubation mit Tyrosin auftretende Substanz des Rf-Wertes 0,9 (Syst.1) zeigt folgende Farbreaktionen:

mit Paulys Reagenz - rot,
mit α-Nitroso-Naphthol - rot,
mit Folins Reagenz - blau,
mit Kaliumferricyanid - keine Reaktion,
mit Ninhydrin - keine Reaktion und

mit Silbernitrat - keine Reaktion.

Das UV-Spektrum zeigte Maxima auf 275 und 222,5 mμ (s.Abb.31).

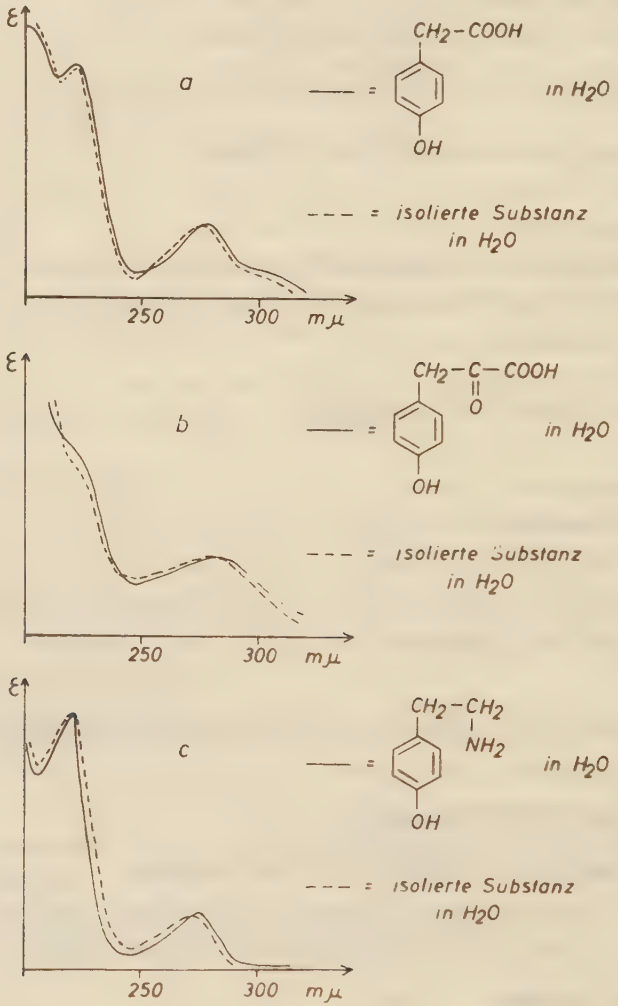


Abb.31. U.V.-Spektra von (a) p-Hydroxyphenylessigsäure
(b) p-Hydroxyphenylbrenztraubens.
(c) Tyramin
_____ synthetische Vergleichssubstanzen
------- isolierte Substanzen

Es handelt sich also um ein p-substituiertes Phenol. Die Substanz wandert im elektrischen Feld bei pH 7 nach dem positiven Pol. Sie ist also bei neutraler Reaktion negativ geladen.

Die Rf-Werte sind in Syst.3 0,85 und in Syst.4 0,92.

Dieselben Farbreaktionen, elektrophoretischen Eigenschaften, UV-Spektrum und Rf-Werte zeigt auch die p-Hydroxyphenylessigsäure.

Damit wurde die Substanz als p-Hydroxyphenylessigsäure identifiziert.

Identifizierung von p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure

Die Substanz mit dem Rf-Wert 0,75 zeigt eine starke graugrüne Fluoreszenz und die folgenden Farbreaktionen:

mit Paulys Reagenz - orange,
mit α-Nitroso-Naphthol - rot,
mit Folins Reagenz - blau,
mit Kaliumferricyanid - keine Reaktion,
mit Ninhydrin - keine Reaktion und
mit ammoniakkalischer Silbernitratlösung - schwarz.

Das UV-Spektrum zeigt ein Maximum bei 282,5 mμ (s.Abb.31).

Im elektrischen Feld wandert die Substanz bei pH 7 nach dem positiven Pol. Rf-Werte: in Syst.3 0,82; in Syst.4 0,85 - 0,86.

Ähnliche Farbreaktionen, elektrophoretische Eigenschaften, UV-Spektrum und Rf-Werte zeigt die p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure.

Somit wurde die untersuchte Substanz als p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure bestimmt.

Nachweis von Glutaminsäure

Die ninhydrinpositiven Flecke vom Rf-Wert 0,1 wurden mit Wasser eluiert und in folgenden Systemen rechromatographiert:

Syst.2 - Rf 0,29 und Syst.3 - Rf 0,72.

Dieselben Rf-Werte zeigt auch mitgelaufene Glutaminsäure, als welche die Substanz damit identifiziert wurde.

Nachweis von Tyramin

Die Substanz des Rf-Wertes 0,5 ergab folgende Farbreaktionen:

mit Paulys Reagenz - orangerot,
mit α-Nitroso-Naphthol - rot,
mit Folins Reagenz - blau,
mit Kaliumferricyanid - keine Reaktion,
mit Ninhydrin - violett und
mit ammoniakalischer Silbernitratlösung - keine Reaktion.

Die Substanz wandert im elektrischen Feld bei pH 7 nach dem negativen Pol. Das UV-Spektrum zeigte Maxima bei 275 und 222 mμ.

Rf-Werte: in Syst.3 0,83; in Syst.4 0,33 und in Syst.6 0,4.

Dieselben Charakteristika besitzt Tyramin, womit die untersuchte Substanz als Tyramin identifiziert ist.

Injektionsversuche

3-8 Tage alte Larven wurden mit einer DESAGA-Mikroinjektionsspritze seitlich in das Abdomen injiziert. Folgende Mengen aktiver Substanzen, in 3-8 μl Wasser gelöst, wurden je Tier gespritzt:

1) Tyrosin, 7200 cnts. pro Tier,
2) Dopa, 8100 cnts. pro Tier,
3) Dopamin, 2100 cnts. pro Tier,
4) N-acetyldopamin, 1800 cnts. pro Tier,
5) Tyramin, 8200 cnts. pro Tier.

24 Std. nach der Injektion wurden 5 Tiere je Altersstufe mit 10 ml 80 %igem Methanol 3 Min. im Potter homogenisiert,

das Homogenat 15 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert, der Überstand rotationsverdampft und in Syst.1 papierchromatographiert.

Die Aktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm wurde gemessen.

Einbauversuche

Es wurden folgende radioaktiv markierte Substanzen in kurz vor der Verpuppung stehende Tiere injiziert: Dopamin, N-acetyldopamin, Tyramin und N-acetyltyramin.

24 Std. nach der Verpuppung wurde die Cuticula abpräpariert, Puppenkörper und Puparium getrennt bei 105° getrocknet und die Radioaktivität durch Naßverbrennungen nach FOLCH-van SLYKE und Messung des Bariumkarbonats bestimmt.

Die Selbstabsorption wurde durch Extrapolation auf unendlich dünne Schichten eliminiert.

Schnürungsversuche

Schnürung:

Sechs Tage alte Tiere (Gruppe 1c in Abb.10) werden mit Äther leicht betäubt. Darauf wird zwischen dem 1. und 2. Körperdrittel (kurz hinter der Ringdrüse) eine Ligatur mit dünnem Baumwollfaden angebracht, die das Tier in eine cephale und eine abdominale Partie trennt. Während die erstere weiterhin unter dem Einfluß der Ringdrüsenhormone steht, ist die Versorgung der hinteren mit diesen Wirkstoffen unterbunden.

Inkubationen mit Homogenaten geschnürter Tiere

Von je 5 Tieren wurden 24 bzw. 48 Stunden nach der Verpuppung des vorderen Teiles das Abdomen abgeschnitten und nach der oben geschilderten Methode homogenisiert und aufgearbeitet.

D. ZUSAMMENFASSUNG

Als Beitrag zur vergleichenden Biochemie des Tyrosinstoffwechsels wurde das Schicksal des Tyrosins bei Insekten untersucht.

Als neuer Metabolit wurde N-acetyldopamin, ein bisher unbekanntes Catecholamin, aus Larven von Calliphora erythrocephala isoliert. Die Menge des in den Tieren vorhandenen N-acetyldopamins hängt vom Entwicklungsstadium ab. Sie nimmt stets zur Verpuppung hin zu, in den Puppen liegt die Substanz als N-acetyldopamin-4-O-ß-Glukosid vor.

Das N-acetyldopamin wurde als eine für die Sklerotisierung wichtige Substanz nachgewiesen. Injektionsversuche mit der radioaktiv markierten Verbindung zeigen, daß sie zum größten Teil in die Cuticula eingebaut wird. Damit ist erstmalig eine Erklärung der bisher unbekannten Funktion von Catecholaminen in Insekten gegeben.

Ausgehend von diesen Befunden werden Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Sklerotisierung und Melanisierung diskutiert.

Durch Verwendung radioaktiv markierter Vorstufen wurde ferner gezeigt, daß Tyrosin die Muttersubstanz des N-acetyldopamins ist; damit wurde zum ersten Mal ein Beweis für die Entstehung von Sklerotisierungssubstanzen aus Tyrosin erbracht.

Der Weg der Biosynthese des N-acetyldopamins aus Tyrosin wurde aufgeklärt; er erfolgt in gleicher Weise wie der der Catecholamine in Wirbeltieren über Dopa und Dopamin.

Die Umwandlung des Tyrosins in Larven von Calliphora erfolgt hauptsächlich über folgende zwei Wege:

a) Transaminierung zu p-Hydroxyphenyl-brenztraubensäure mit anschließender oxydativer Decarboxylierung zu p-Hydroxyphenyl-essigsäure bzw.

b) über Dopa und Dopamin zum N-acetyldopamin.

Die Bevorzugung eines dieser beiden Wege ist vom Alter der Larven abhängig. Junge Larven (bis zum Beginn des 3. Stadiums) bauen Tyrosin hauptsächlich zu p-Hydroxyphenylessigsäure ab; Larven des späten 3. Stadiums produzieren vorwiegend N-acetyldopamin.

Auf diese Weise wird vor der Verpuppung eine ausreichende Menge des für die Sklerotisierung nötigen N-acetyldopamins bereitgestellt.

Die Umsteuerung des Tyrosinstoffwechsels ist - wie sich durch Ausschaltungs- und Injektionsversuche zeigen läßt - durch das Häutungs- und Verpuppungshormon Ecdyson ausgelöst.

Damit ist ein weiterer Beitrag zum Verständnis der Wirkungsweise von Hormonen durch Beeinflussung von Enzymgefügen erbracht.

E. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. BUTENANDT et al: Naturwissenschaften, 28, 63 (1940)
2. BUTENANDT et al: Naturwissenschaften, 28, 447 (1940)
3. BUTENANDT et al: Z.Naturforsch., 4b, 242 (1949)
4. CLEVER, U. und KARLSON, P.: Expt.Cell Res. 20, 623 (1960)
5. BUTENANDT, A. und KARLSON, P.: Z.Naturforsch., 9b, 389 (1954)
6. LIEBIG, J.: Ann. 57, 127 (1846)
7. ERLENMEYER, E. und KIPP, A.: Ann. 219, 161 (1883)
8. RYDON, H.N.: Biochem.Soc.Symposia (Cambridge, England, 1, 40 (1948)
9. BUBL, E.C. und BUTTS, J.S.: J.Biolog.Chem. 174, 637 (1948)
10. LERNER, A.B.: Adv.Enzym. 14, 73 (1953)
11. KNOX, W.E.: in "Amino Acid Metabolism" W.McElroy u.B.Glass, eds The John Hopkins Press, Baltimore (1955) p. 831
12. DALGLIESH, C.E.: Adv.Prot.Chem., 10, 33 (1955)
13. UDENFRIEND, S. und COOPER, J.: J.Biol.Chem. 194, 503 (1952)
14. KAUFMANN, J.: J.Biol.Chem., 226, 511 (1957)
15. KAUFMANN, J. und DEVENBERG, B.J.: J.Biol.Chem., 234, 2677 (1959)
16. NEUBAUER, O.: Deuts.Arch.Klin.Med. 70, 44
17. NEUBAUER, O.: Handb.d.Norm.u.Path.Physiol. (Bethe et al, 1928) Vol.5, p.67
18. LA DU, B.N.jr. und GREENBERG, D.M.: J.Biol.Chem., 190, 245 (1951)
19. LA DU, B.N.jr. und FINK, M.: Fed.Proc. 10, 212 (1951)
20. CANELLAKIS, N. und COHEN, P.P.: J.Biol.Chem. 223, 63 (1956)
21. KNOX, W.E. und LE MAY-KNOX, M.: Biochem.J., 49, 686 (1951)

22. UCHIDA, M. et al.: J.Biochem. (Japan) 41, 41 (1954)
23. SHEPARTH, B. und GURIN, S.: J.Biol.Chem., 180, 663 (1949)
24. KNOX, W.E. und Edwards, J.W.: Fed.Proc., 13, 242 (1954)
25. RAVDIN, R.G. und CRANDALL, D.J.: J.Biol.Chem., 189, 137 (1951)
26. GARROD, A.E.: Inborn Errors in Metabolism, 2nd Ed. Henry Froude and Holder & Houghton, London (1923)
27. MEDES, G.: Biochem.J. 26, 917 (1932)
28. LA DU, B.N.jr. et al: J.Biol.Chem. 230, 251 (1958)
29. GURIN, S. und DELLUVA, A.M.: J.Biol.Chem. 170, 545 (1947)
30. UDENFRIEND, S. et al.: Science 117, 663 (1953)
31. UDENFRIEND, S. und WYNGAARDEN, S.B.: Bioch.Bioph.Acta 20, 48 (1956)
32. LEEPER, L.L. und UDENFRIEND, S.: Fed.Proc. 15, 298 (1956)
33. KIRSHNER, N.: Fed.Proc. 18, 261 (1959)
34. LEVIN, E.Y. et al.: Fed.Proc. 18, 272 (1959)
35. PITT-RIVERS, R. und TADA, J.R.: The Thyroid Hormones, Pergamon Press, London, 1959
36. HILLMANN, G.: Biosynthese und Stoffwechselwirkung der Schilddrüsenhormone. Stuttgart, 1961. Thieme Verlag
37. MASON, H.S.: Adv.Enz. 16, 105 (1955)
38. FITZPATRICK, T.B. et al.: The Biology of Hair Growth, Academic Press (1958) p. 255
39. HARLEY-MASON, H.: 17. Inter.Kongreß f. Reine u. Angew. Chemie, Band 2
40. KNOX, W.C.: Am.J.Hum.Gen. 10, 95 (1958)
41. RAPER, H.S.: Biochem.J., 21, 89 (1927)
42. RAPER, H.S.: Physiol.Rev., 8, 245 (1928)
43. MASON, H.S.: J.Biol.Chem. 172, 83 (1948)

44. BU'LOCK, B.D. et al.: Biochem.J., 47, XXXII (1950)
45. BU'LOCK, B.D. und HARLEY-MASON, J.: J.Chem.Soc., 703, (1951)
46. BOURQUELOT, E. und PERTRAND, G.: Compt.rend.Soc.Biol. 47, 582 (1895)
47. FITZPATRICK, T.B.: Arch.Dermat.Syph., 65, 379 (1952)
48. KARLSON, P. und LIEBAU, H.: Unveröffentlicht.
49. HOLTZ, P. und JANISCH: Arch.Exp.Path.Pharm., 186, 684 (1937)
50. HOLTZ, P. et al.: Z.Physiol.Chem., 262, 111 (1938)
51. JONES, J.P. et al.: Biochem.J., 51, XI (1950)
52. SUDO, M. und TAKEDA, Y.: J.Biochem. (Japan) 37, 375 (1958)
53. DALGLIESH, S.: J.Gen.Microb., 8, 1 (1953)
54. SENTHESHANMUGANATHAN, S. und ELSDEN, S.R.: Biochem.J., 69, 21 (1958)
55. GALE, E.T.: Biochem.J., 34, 392 (1940)
56. GALE, E.T.: Adv.Enz. 6, 1 (1946)
57. BROW, S.A. und NEISH, A.C.: Canad, J.Bioch.Physiol. 33, 948 (195)
58. BROW, S.A. und NEISH, A.C.: Canad, J.Bioch.Physiol. 34, 769 (1956)
59. HIGUCHI, T.: Studies on the Biosynthesis of Lignin. Proc.IV. Intern. Congreß Biochem.Vienna (1958) Pergamon Press, s.161
60. NEISH, A.C.: IV.Inter.Congress Biochem. Vienna (1958) Pergamon Press, s. 213
61. KILBY, B.A. und NEVILLE, E.: J.Expt.Biol. 34, 276 (1957)
62. DESAI, R.M. und KILBY, B.A.: Arch.Int.Physiol., 66, 257 (1958)
63. PRYOR, M.G.M.: Proc.Roy.Soc. London Ser.B 128, 378, 393 (1940)

64. PRYOR, M.G.M. et al.: Biochem.J., 40, 627 (1946)
65. FRAENKEL, G. und RUDALL, K.M.: Proc.Roy.Soc. London Ser B 129, 1 (1940)
66. FRAENKEL, G. und RUDALL, K.M.: Proc.Roy.Soc., 134, 11 (1947)
67. HACKMANN, R.H.: Biochem.J., 54, 362, 367 (1953)
68. HACKMANN, R.H.: Proc. IV.Inter.Congress Biochem. Vienna (1958) Pergamon Press, s. 48
69. SCHMALFUSS, H. et al.: Biochem.Z., 257, 188 (1933)
70. SCHMALFUSS, H.: Biochem.Z., 294, 112 (1937)
71. PRYOR, M.G.M. et al.: Nature, 169, 399 (1947)
72. PRYOR, M.G.M. et al.: Biochem.J., 43, 474 (1948)
73. KAWASE, S.: Nature, 181, 1350 (1958)
74. GOODWIN, T.W.: Biol.Rev.Cambridge, 27, 439 (1952)
75. KARLSON, P. und RAECKE, I.: Unveröffentl.
76. DENNELL, R.: Proc.Roy.Soc., London, Ser. B 148, 280 (1958)
77. HUNTER-Jones, P.: Nature, 180, 236 (1957)
78. MALEK, S.R.A.: Nature, 180, 237 (1957)
79. JONES, B.M. und SINCLAIR, W.: Nature, 181, 926 (1958)
80. KARLSON, P.: Proc. IV. Inter. Congress Biochem. Vienna (1958) s. 37
81. KARLSON, P.: Z.Physiol.Chem., 318, 194 (1960)
82. HACKMAN, R.H.: Australian J.Biol.Sci., 9, 400 (1956)
83. DENNELL, R.: Proc.Roy.Soc. London, Ser B 136, 79 (1947)
84. SCHWEIGER, A.: Dissertation, München 1960
85. KARLSON, P. und SCHWEIGER, A.: Z.Physiol.Chem., 323, 199 (1961)
86. ZILLIG, W.: Dissertation, Tübingen 1952
87. BUTENANDT, A. et al.: Arch.Bioch. Bioph., 83, 76 (1959)

88. OKUBO, S.: Med.J. Osaka Univ., 9, 327 (1958)
89. KARLSON, P. und AMMON, H.: Unveröffentl.
90. ÖSTLUND, E.: Acta Physiol. Scand., 31, Suppl. 112 (1954)
91. BRUNET, P.C.J. und KENT, P.W.: Proc.Roy.Soc. London, Ser B 144, 259 (1955)
92. BROWN, G.W.jr. et al.: J.Biol.Chem., 234, 1775 (1959)
93. PAIK, W.K. und COHEN, P.P.: J.Gen.Physiol., 43, 683 (1960)
94. METZENBERG, R.L. et al.: J.Biol.Chem., 236, 162 (1961)
95. PARTRIDGE, S.M.: Nature, 158, 270 (1946)
96. GRENGROSS, et al.: Ber. 66, 435 (1933)
97. FEARON, W.O.: Biochem.J., 38, 399 (1944)
98. JAMES, W.O.: Nature 161, 851 (1948)
99. PARTRIDGE, S.M.: Nature 164, 443 (1949)

Lebenslauf

Am 12. 6. 1933 wurde ich als dritter Sohn des Ministerialrates Evangelos Sekeris und seiner Ehefrau Polyxeni, geb. Eulambio, in Nauplia/Griechenland geboren. Von 1939 - 1941 besuchte ich die Protopapa-Volksschule in Athen. 1941 siedelte mein Vater als Mitglied der Exilregierung mit seiner Familie nach den USA über. Dort besuchte ich von 1941 - 1944 die Volksschule in New York und Grand Rapids/Michigan und von 1944 - 1945 die Oberschule.

1945 kehrte unsere Familie nach Griechenland zurück. In den Jahren 1945 - 1950 absolvierte ich das 8. Gymnasium in Athen. 1950 immatrikulierte ich mich in der Medizinischen Fakultät der Universität Athen. Nach sechsjährigem Studium erhielt ich dort im November 1956 das Diplom mit dem Prädikat "sehr gut". Vom Januar 1957 bis Juli 1959 leistete ich meine Dienstpflicht als Militärarzt im griechischen Heer ab. Seit September 1959 arbeite ich dank eines Stipendiums des Deutschen Akademischen Austauschdienstes im Laboratorium von Herrn Professor Dr. Peter Karlson im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München.